



# BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR HIDROCARBUROS MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE DIFERENTES CEPAS BACTERIANAS A ESCALA DE LABORATORIO

David Leonardo Pinto Varón	Cód. 064101029
Victor Daniel Sánchez Vargas	Cod. 064112018

Universidad Libre  
Facultad de Ingeniería  
Departamento de Ingeniería Ambiental  
Prevención y control Ambiental  
Bogotá  
2018



BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR  
HIDROCARBUROS MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE DIFERENTES CEPAS  
BACTERIANAS A ESCALA DE LABORATORIO

David Leonardo Pinto Varón	Cód. 064101029
Victor Daniel Sánchez Vargas	Cod. 064112018

Propuesta de Trabajo de Grado para optar al título de Ingeniero Ambiental

Director: María Teresita Ortiz Villota Ph.D. in Biology

Universidad Libre  
Facultad de Ingeniería  
Departamento de Ingeniería Ambiental  
Prevención y Control Ambiental  
Bogotá  
2018



## DECLARATORIA DE ORIGINALIDAD

“La presente propuesta de trabajo de grado para optar al título de Ingeniero Ambiental de la Universidad Libre no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de calificación alguna, ni de título, o grado diferente o adicional al actual. La propuesta de proyecto de grado es resultado de las investigaciones del autor (es), excepto donde se indican las fuentes de Información consultadas”

---

David Leonardo Pinto Varón  
064101029

---

Víctor Daniel Sánchez Vargas  
064112018



## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo de grado fue realizado bajo la dirección y asesoría de la doctora María Teresita Ortiz Villota, quien con su dedicación, tiempo y conocimiento hizo posible la realización de esta investigación, queremos agradecer su apoyo en todo momento y su voluntad para que todo saliera de la mejor manera, así mismo queremos dedicar este trabajo a su salud y pronta recuperación.

A la Universidad Libre por brindarnos las herramientas, el espacio y el apoyo académico durante la realización del presente trabajo de grado.

Al Director del programa de Ingeniería Ambiental, Oscar Leonardo Ortiz, que gracias a su apoyo y gestión logramos culminar este trabajo de grado y optar al título de Ingenieros Ambientales

A los docentes del programa de ingeniería ambiental que con sus conocimientos y su ayuda fueron partícipes de este trabajo de grado, en especial, a la docente Lizeth Manuela Avellaneda que nos asesoró y nos facilitó la obtención de insumos para nuestro trabajo de grado.

A cada una de las personas encargadas de los laboratorios de ingeniería ambiental quienes acompañaron y con su voluntad aportaron para terminar este trabajo de grado.



A nuestras familias que con su apoyo incondicional nos ayudaron a sobrepasar momentos difíciles que se presentaron a lo largo de nuestra carrera y en la elaboración de esta investigación, agradecemos su paciencia y su sacrificio.



## **1. CONTENIDO**

<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>4</b>
<b>1.</b>	<b>13</b>
<b>2.</b>	<b>15</b>
<b>3.</b>	<b>19</b>
<b>3.1. Objetivo General:</b>	<b>16</b>
<b>3.2. Objetivos Específicos:</b>	<b>16</b>
<b>4.</b>	<b>20</b>
<b>4.1. Marco Histórico</b>	<b>17</b>
4.1.1. Antecedentes	17
<b>4.2. Marco Conceptual</b>	<b>20</b>
4.2.1. Biorremediación:	20
4.2.2. Bioaumentación:	21
4.2.3. Suelos contaminados:	21
4.2.4. Crecimiento microbiano:	22
4.2.5. Bacterias Degradadoras de Hidrocarburos:	22
4.2.6. Biodegradación de Hidrocarburos:	22
<b>4.3. Marco Teórico</b>	<b>22</b>
4.3.1. Cuantificación de los Hidrocarburos:	25
4.3.1.1. Métodos analíticos:	25
<b>4.4. Marco Legal</b>	<b>26</b>
<b>4.5. Marco Tecnológico</b>	<b>29</b>



**5. 35**

5.1 Pruebas Físico Químicas del Suelo	34
5.2 Inoculación de las Bacterias:	35
5.3 Siembra de las Bacterias en el Suelo:	37
5.4 Contaminación de Suelo o Terrarios de Experimentación:	37
5.5 Análisis de la Degradación de los Hidrocarburos:	37
5.5.1 Recuperación de Hidrocarburos en el Suelo:	37
5.5.2 Extracción Soxhlet:	37
5.5.3 Extracción Agitación/Centrifugación:	38
5.5.4 Espectrofotometría Infrarrojo:	39
5.6 Análisis de Datos:	39

**6. 45**

6.1. Análisis de suelo:	40
6.1.1 Análisis de ph:	40
6.1.2 Análisis Temperatura	42
6.2. Inoculación de las Bacterias:	43
6.3. Preparación de los Terrarios:	45
6.4. Análisis por Medio de Espectrofotómetro Infrarrojo:	46
6.4.1 Análisis Cualitativo de la Degradación de Hidrocarburos	46
6.4.2 Análisis Cuantitativo de la Degradación de Hidrocarburos	50
6.5 Análisis de Eficiencia de las Cepas Bacterianas Usadas:	53

**7. 60**



ANEXOS

59

8. 72





## LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Valores de pH	42
Gráfica 2. Temperatura	44
Gráfica 3. Suelo sin contaminante + KBr	48
Gráfica 4. Suelo contaminado con Gasolina + KBr	50
Gráfica 5. Suelo contaminado con Diesel + KBr	51
Gráfica 6. Espectrofotograma Diesel	53
Gráfica 7. Espectrofotograma Gasolina	66

## LISTA DE TABLAS



Tabla 1. Normatividad Aplicable	22
Tabla 2. Actividades para Desarrollo de las Fases	28
Tabla 3. Características de los Terrarios	29

## **LISTA DE ILUSTRACIONES**



Ilustración 1. Terrarios de experimentación	34
Ilustración 2. Inoculación de bacterias	37
Ilustración 3. Extracción Soxhlet	40
Ilustración 4. Monitoreo 18 horas	46
Ilustración 5. Monitoreo 24 horas	46

## **ANEXOS**



Anexo 1. Agar Sangre	62
Anexo 2. Cepas Bacterianas	62
Anexo 3 . Esterilización del ambiente	63
Anexo 4. Suelo contaminado con Gasolina + KBr Réplica 2	63
Anexo 5. Suelo contaminado con Gasolina + KBr Réplica 3	64
Anexo 6. Suelo contaminado con Diesel + KBr Réplica 2	64
Anexo 7. Suelo contaminado con Diesel + KBr Réplica 3	65
Anexo 8. Curva de Calibración Diesel	65
Anexo 9. Espectrofotograma Suelo Contaminado con Diesel Inicial	66
Anexo 10. Espectrofotograma Pseudomona Putida – Diesel	66
Anexo 11. Espectrofotograma Acinetobacter Baumannii - Diesel	68
Anexo 12. Espectrofotograma Degradación Natural - Diesel	69
Anexo 13. Espectrofotograma Suelo sin Contaminar - Diesel	71
Anexo 14. Curva de Calibración Gasolina	72
Anexo 15. Espectrofotograma Gasolina Inicial	72
Anexo 16. Espectrofotograma Acinetobacter Baumannii - Gasolina	73
Anexo 17. Espectrofotograma Biorremediación Natural – Gasolina	74



## 1. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

Colombia ha vivido una época de catástrofes y problemáticas causadas por diferentes grupos revolucionarios; la rotura y daño de oleoductos se han convertido en los principales problemas ocasionados por estos grupos insurgentes. Los derrames de petróleo ocasionados por atentados a los oleoductos presentan grandes impactos a la fauna, a la flora, al valor paisajístico local al contaminar el suelo, y las fuentes de agua; debido a su rápida expansión tanto en medio acuoso como en el suelo, es de vital importancia dar una pronta solución.

Otros de los factores más incidentes en la contaminación de suelos es el manejo inadecuado de los hidrocarburos en su almacenamiento y distribución, deterioro de equipos, manejo inadecuado del material y errores humanos.

Los combustibles como materiales peligrosos han generado problemas ambientales en el mundo, contaminando suelos, aire y agua. Entre las más severas contaminaciones se destacan las que se produjeron y todavía se producen a causa de la extracción y el manejo del petróleo en todos los países productores de hidrocarburos. (Benavides, J., Quintero, G., Guevara, A., Jaimes, D., Gutiérrez, S., & Miranda, J., 2005).

La sociedad necesita explotar sus recursos para efectuar un progreso, pero también se ve en la necesidad de prevenir los impactos negativos en materia ambiental y mitigarlos. Este proyecto de investigación se encamina precisamente a la biorremediación de dichos suelos contaminados, teniendo en cuenta que estos son



necesarios para la manutención de varias familias, ya sea, a través de actividades agrícolas y pecuarias o cualquier proceso relacionado con el sector alimenticio.

A lo largo del desarrollo industrial se realizan prácticas para la obtención de petróleo, dichas prácticas han traído repercusiones al medio ambiente debido a una mala planeación del cuidado de los recursos, por ende es de vital importancia utilizar un método adecuado tanto para la prevención como para la recuperación de suelos afectados; debido a que “la contaminación de suelos por exploración, explotación y procesamiento de petróleos y sus derivados causa cambios físicos y químicos en los suelos.” (García, Pandián, Aguilar, Ruiz, & Durán de Bazua, 2004).

“Se han efectuado procesos de biorremediación natural por medio de bacterias en suelos, las cuales degradan hidrocarburos a través de procesos de alimentación, depurando así los suelos.” (Benavides et al. 2005). Los combustibles como la gasolina y el diésel son unos de los más implicados en los incidentes de contaminación por hidrocarburos en los suelos, esto por causa de accidentes cuando son transportados y ocurren fugas o derramamientos de líquido afectando las zonas en grandes áreas.

Las bacterias fueron elegidas en primera instancia por la accesibilidad para adquirirlas, debido a que cierto tipo de bacterias no son de fácil acceso, estas cepas son de alto comercio, su manejo no contiene afectaciones a la salud del laboratorista o manipulador del cultivo, y por su bajo costo en comparación de otras



cepas bacterianas, además de estos factores los antecedentes de efectividad que tienen estas cepas es lo que las hace idóneas para el efecto de este proyecto. Los combustibles elegidos, son los más fáciles de conseguir en el mercado y por ende los más implicados en contaminación del medio ambiente.

Con esta investigación se busca biorremediar suelos contaminados por dichos compuestos por medio de cepas de bacterias a escala de laboratorio, probando su eficacia. Ahora bien, sabiendo que estas bacterias que degradan los hidrocarburos en suelos, se busca evaluar ¿Cuál de las bacterias utilizadas en este proyecto es la más eficaz para degradar hidrocarburos como diésel y gasolina?

## 2. JUSTIFICACIÓN

Se ha determinado el efecto positivo que brindan ciertas bacterias a la hora de degradar diferentes hidrocarburos presentes en suelos, entre las más usadas para esta tarea son la *Pseudomona putida* y la *Acinetobacter baumannii*. De acuerdo con las propiedades de dichas bacterias y los estudios anteriores, fueron los criterios para su selección en este proyecto. Los combustibles objeto de estudio son hidrocarburos como la gasolina y el diésel, debido a la mayor facilidad para acceder a ellos y a sus antecedentes como contaminante de suelos y acuíferos por derrame y mal uso de ellos.

“La *P. putida* posee la capacidad de degradar alcanos por secuenciación en el plásmido octano (OCT), el cual es el encargado de la degradación del octano y por



esta razón recibe la terminación OCT, que codifica una enzima dioxigenasa del n-alkyl sin un intermediario del alcohol, conocido como la vía de Finnerty. Las *A. baumannii* son eficientes en la degradación de fracciones de alcanos y se ha observado que la biodegradación de gasolina en suelo y agua de sitios contaminados es eficiente.” (Benavides et al, 2005)

“Un derrame de hidrocarburos conlleva una serie de cambios progresivos en las propiedades fisicoquímicas del crudo, los cuales se atribuyen al proceso de la pérdida de ciertos componentes del petróleo, a través de una serie de procesos naturales que comienzan una vez que ocurre el derrame y continúan indefinidamente. Existen distintos tipos de crudo que tienen comportamientos diferentes en su contacto con el medio ambiente, pero en todo caso, mayor o menor, el daño sobre el ambiente es inevitable.” (Carrero., 2015). Cuando el hidrocarburo hace contacto con el medio ambiente, se presentan unos cambios fisicoquímicos en su composición. “Como primera instancia ocurre la intemperización, esta varía según las características del hidrocarburo y las condiciones climáticas. Posterior a este proceso ocurren: evaporación, disolución, sedimentación, oxidación, y biodegradación” (Riesco, 2012)

Esta investigación de la biorremediación del suelo con bacterias es importante desde varios puntos de vista, en especial el ambiental, por la recuperación del suelo para diferentes usos, descontaminar las fuentes de agua afectadas por escorrentía y para descontaminar acuíferos, además desde el punto de vista económico

En el estudio hecho por López de Mesa, J. B. en. (Benavides, et al, 2005), en cuanto a la utilización de diferentes tipos de cepas bacterianas para la degradación de hidrocarburos, se puede evidenciar la importancia que poseen dichas cepas para la biorremediación de los suelos contaminados por hidrocarburos.





“Otros microorganismos degradadores de hidrocarburos que se encontraron son los *Bacillus* en sus diferentes tipos (*cereus*, *sphaericus*, *fusiformis* y *pumilis*), las *Acinetobacter junii* y *Pseudomonas sp.*” (Téllez & Valderrama, 2000)

Este proyecto de investigación es importante, porque los suelos explotados y contaminados con hidrocarburos, muchas veces tienden a desertizarse o regenerarse de una manera muy lenta. Es necesario recuperar las zonas verdes para combatir lo que hoy nos acecha, como lo es el calentamiento global que provoca sequías, desertización, etc., “la acumulación de gases de efecto invernadero es producto de estos hechos, debido a que no hay un balance entre la biodegradación y la contaminación de hidrocarburos.” (Comunidad de Madrid, 2007).

Otra de las razones por las cuales este trabajo se llevó a cabo es debido al excesivo uso de hidrocarburos considerados económicamente más rentable que el uso de energías alternativas y renovables al momento de utilizarse como combustibles. Los combustibles fósiles generan un mayor deterioro de la zona explotada en comparación con la utilización de energías alternativas, por esta razón este proyecto busca utilizar bacterias con la capacidad de degradar los hidrocarburos en los suelos que previamente han sido preparados en diferentes concentraciones de los mismos (gasolina y diésel) con la finalidad de remediarlos y disminuir la afectación provocada por la contaminación.



De acuerdo con García. et al, (2004) el conocer si hay presencia de hidrocarburos en un suelo es importante porque se puede conocer la metodología más adecuada para tratar los suelos contaminados con hidrocarburos

Las bacterias seleccionadas para este proyecto “traen beneficios ecológicos en sus usos, al tratar los suelos con dichos microorganismos al no tener más alimento, que en este caso serán los hidrocarburos presentes en el suelo, luego de un proceso degradativo estas tienden a morir y convertirse en material orgánico.” (Braibant, C., 2014)

A nivel económico las cepas no tienen un costo muy elevado y dependiendo de sus características se pueden adquirir fácilmente, el tratamiento al suelo es de bajo costo al no usar herramientas que sean de muy alta tecnología, para el cultivo de las bacterias y su adquisición, es necesario remitirse a laboratorios certificados, donde se han aislado las bacterias necesarias para cada tipo de estudio, o por su potencial para ello, esto debido a la manipulación genética que han sufrido en dichos laboratorios. La aplicación de estas bacterias no tiene un efecto secundario, al acabarse el alimento para las bacterias, en este caso el hidrocarburo como única fuente de carbono, ellas morirán y se convertirán en biomasa para el suelo.



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo General:**

Evaluar la eficacia de dos cepas bacterianas en el proceso de biorremediación de suelos previamente preparados con contaminantes de hidrocarburos (gasolina y diesel) a escala de laboratorio.

#### **3.2. Objetivos Específicos:**

- Evaluar el proceso de degradación de dos tipos de hidrocarburo (Gasolina y Diesel) con cepas bacterianas mediante espectroscopia de infrarrojo.
- Analizar la capacidad de degradación de las cepas bacterianas estudiadas con base en los resultados obtenidos por el método anterior.
- Determinar cual de las cepas bacterianas es más eficiente en el proceso de hidrocarburos (Gasolina y Diesel)



## **4. MARCO REFERENCIAL.**

### **4.1. Marco Histórico**

#### **4.1.1. Antecedentes**

Anteriormente se han utilizado microorganismos como las bacterias para la degradación de compuestos orgánicos contaminantes tanto en suelos como en aguas subterráneas, dichos microorganismos han sido usados para distintos objetivos ya sea para la biorremediación de los suelos o descontaminación de aguas residuales. Como es de saberse, la recuperación de suelos contaminados por hidrocarburos ha venido avanzando poco a poco. Desde la década de 1980 fue impuesto el término de biorremediación, “los científicos observaron que era posible aplicar estrategias de remediación que fuesen biológicas, basadas en la capacidad de los microorganismos de realizar procesos degradativos.” (Tejedor, 2006). De las primeras observaciones que se identificaron de biorremediación fueron con el petróleo, seguidas de algunos organoclorados y otras observaciones de los organofosforados, en esta década también se afirmó que los microorganismos además de ser patógenos contenían una gran capacidad de absorción de compuestos orgánicos, naturales y sintéticos, y también poseen la capacidad para degradarlos, que es el objetivo de la biorremediación.



En el año 1989 ocurrió un gran desastre ambiental, el desastre de “Exxon Valdez” fue un derrame de petróleo provocado por el petrolero Exxon Valdez el 24 de marzo de 1989, “este "supertanker", propiedad, por entonces, de la compañía Exxon Shipping Co., encalló en las costas de Alaska, vertiendo cantidades ingentes de crudo sobre el Prince William Sound. El accidente se produjo por una incorrecta y negligente maniobra del buque, que en aquel periplo estaba al mando del Capitán Joseph Hazelwood, quien, en su día, había sido tratado por problemas serios con el alcohol, no controlados adecuadamente con posterioridad, y que, como señala castizamente el propio Tribunal Supremo norteamericano, el mismo día en que el petrolero "Exxon Valdez" zarpó del puerto de origen con destino a su tragedia” (Llorente, 2008). Uno de los reporteros enviado a Alaska pensaba que el petróleo no provocaría un daño ambiental irreparable y tal como se ha ido observando a lo largo de los años el hidrocarburo después de bastante tiempo es diluido y asimilado por el medio ambiente. Gracias a esto es que surge la biorremediación como una de las tecnologías que usa un elemento biológico como lo son los microorganismos para la eliminación de los contaminantes de un lugar.

En el año 2000 el Colegio de Ingenieros y Agrimensores de Puerto Rico (CIAPR) hizo un proyecto de biorremediación para eliminar diésel, esta empresa dedicada a la eliminación de contaminantes en suelos y acuíferos usaba técnicas innovadoras que fuesen ambientalmente seguras. En este proyecto se efectuó una biorremediación del



subsuelo y del acuífero afectado con combustible diésel. Las acciones remediativas que se llevaron a cabo fueron las siguientes:

- Recuperación de producto libre o “diésel” del agua subterránea
- Biorremediación “In-situ” en suelos contaminados
- Biorremediación “In-situ” del agua subterránea contaminada

Para poder acelerar el proceso de biorremediación, se desarrolló un consorcio de microorganismos degradadores de diésel bajo condiciones anaeróbicas. “Se cultivaron bacterias endógenas desnitrificadoras del lugar contaminado. Estas bacterias fueron enriquecidas con nutrientes en una solución bioactiva, la cual fue inyectada a una profundidad de 14 y 18 pies en los pozos monitoreados.” (CIAPR, 2000). Los resultados que se obtuvieron fueron los siguientes:

- Se completó la remediación aproximadamente de 30,000 yardas cúbicas de suelo y acuífero contaminado con diésel cubriendo un área de aproximadamente 40,000 pies cuadrados a una profundidad de 20 pies.
- Se implementó como innovación un protocolo de bioestimulación anaeróbica para degradar hidrocarburos en suelos saturados usando un método de aireación mecánica.
- Se desarrolló un consorcio de microorganismos degradadores de diésel donde se comprobó la eliminación de los contaminantes en



menos de 30 días, evitando la importación de microorganismos exógenos.

- Se cumplió con todas las regulaciones y leyes ambientales estatales y federales para el desarrollo de este proyecto.

Este proyecto de la CIAPR fue efectivo y dio una gran solución al problema de la contaminación de los suelos, dando un impulso inmenso al concepto de la biorremediación, “hoy en día podemos ver que la tierra está cada día más enferma por la gran cantidad de contaminantes que son liberados al ambiente. Esto perjudica a los ecosistemas, provocando severos daños a todos los seres vivos, incluyendo al hombre.” (Tejedor, 2006).

De acuerdo con lo expresado por Cristina Tejedor, hoy en día la tierra sigue enferma, los contaminantes han ido en gran aumento por acción antrópica, además de eso, los accidentes han sido en gran parte los contribuyentes a que los suelos y acuíferos se vean afectados por la contaminación. En estos días el trabajo con microorganismos va en aumento y las técnicas de biorremediación están sujetas a muchas innovaciones las cuales son más efectivas y sin duda alguna más fáciles para su ejecución.

## **4.2. Marco Conceptual**

### **4.2.1. Biorremediación:**

“Como su nombre lo indica (bio=vida, remediación=arreglo o remediación) corresponde al arreglo del ambiente con seres vivos, más



estrictamente hablando, se refiere a los procesos de degradación de contaminantes o transformación de ambientes contaminados con el uso de organismos vivos o sus derivados. Actualmente se conoce como biorremediación a los procesos que utilizan las habilidades de los organismos vivos para degradar y/o transformar contaminantes ambientales tanto en ecosistemas terrestres como acuáticos hasta niveles que no representen peligro para el humano o al ambiente” (Garbisu, Amézaga, & Alkorta, 2002).

#### 4.2.2. Bioaumentación:

“Incremento en la cantidad de agentes descontaminantes, en especial los microorganismos (bacterias, actinomicetos), proceso que se puede llevar a cabo tanto *in-situ* como *ex-situ*, siempre dependiendo de factores económicos, del tipo de contaminante y de las facilidades que existan para manejo *ex-situ* o la adquisición de los biorremediadores en las cantidades y de la calidad requeridos.” (*Universidad Nacional Abierta y a Distancia “UNAD”, 2012*).

#### 4.2.3. Suelos contaminados:

“Todo aquél cuyas características físicas, químicas o biológicas han sido alteradas negativamente por la presencia de componentes de carácter peligroso de origen humano, en concentración tal y con





un riesgo para la salud humana o el medio ambiente, de acuerdo con los criterios y estándares que se determinen por el gobierno.” (*Jefatura de Estado Española*, 1998).

#### 4.2.4. Crecimiento microbiano:

“La amplificación o multiplicación de microorganismos tales como bacteria, algas, diatomeas, plancton y hongos.” (*Environmental Protection Agency “EPA”, 2012*).

#### 4.2.5. Bacterias Degradadoras de Hidrocarburos:

“Se les da este nombre a ciertas bacterias que poseen la capacidad de usar el carbono de los Hidrocarburos como fuente de energía. Estas degradan los Hidrocarburos en sustancias químicas no contaminantes.”(*Cosmos Online*, 2016)

#### 4.2.6. Biodegradación de Hidrocarburos:

“La biodegradación se define como la capacidad de los agentes biológicos de remover los hidrocarburos presentes en un lugar contaminado con estos.”(López, 2012)



### 4.3. Marco Teórico

La biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos es un proceso natural que se da con el pasar del tiempo, las bacterias y/o microorganismos son un factor importante en este proceso, estos son los encargados de reducir las cadenas largas que componen a los hidrocarburos y hacerlas más simples para que su descomposición sea más rápida y efectiva , haciendo de este método un tratamiento viable y sencillo para descontaminar los suelos que poseen vertimientos de altas cantidades de hidrocarburos. Las bacterias necesitan un ambiente ideal para llevar a cabo la degradación pertinente de los hidrocarburos, así mismo para su reproducción y sostenimiento frente al crecimiento de la población bacteriana, estos microorganismos por lo general son autóctonos del suelo contaminado. Cuando las condiciones ambientales y las unidades formadoras de colonias (UFC) no son suficientes son necesarios los métodos de ingeniería para establecer dicha necesidad. Existen algunos problemas para la sostenibilidad de las bacterias entre las cuales la de mayor importancia es la cantidad de contaminante vertido en el suelo, si la concentración del contaminante es demasiado alta en comparación a la cantidad de bacterias cultivadas, el suelo puede tomar propiedades tóxicas para los microorganismos lo cual elevaría el índice de mortalidad. Si el suelo tiene muy pocos nutrientes es una característica que impediría la reproducción elevada de las bacterias y si son mínimas las concentraciones de nitrógeno y fósforo se dará una biodegradación del contaminante de una manera muy lenta. La actividad microbiana se ve afectada en varias formas ya sean por humedad en el suelo, temperatura,



bajas cantidades de nutrientes inorgánicos (Fósforo y Nitrógeno), pH, metales pesados presentes en el suelo, la cantidad de material orgánico y el tipo de material orgánico presente en el suelo seleccionado. Las bacterias tienen un crecimiento exponencial y una mayor capacidad de adaptarse a un medio contaminado, la biodegradación de los hidrocarburos se puede realizar por dos grupos de microorganismos: los hongos y las bacterias; esta depende de un suministro de agua adecuado, para ello es importante saber cuál es la cantidad de agua necesaria para los microorganismos, esta cantidad puede conocerse de manera indirecta por la capacidad de campo en la cual la textura y porosidad del suelo son esenciales. Los contenidos de humedad óptimos para una buena biodegradación de hidrocarburos están entre el 70% y el 95% de la capacidad del terreno.

Cuando no se tienen las condiciones necesarias para que la biorremediación se lleve a cabo de manera adecuada, factores como un clima frío ocasionan que los microbios trabajen de una manera más pasiva y lenta, se puede hacer uso de aditivos que le proporcionen unas mejores condiciones al suelo. (Braibant, 2014)

La biorremediación se lleva a cabo por medio de varios métodos, entre ellos el que nos compete en el proyecto de investigación es la bioaumentación incorporando cepas bacterianas al suelo contaminado para generar la biodegradación; otros métodos como la fitorremediación, bioestimulación, y demás son usados según las características del lugar y las condiciones en que se encuentran. (Boullosa, 2011)



Técnicas de Recuperación de Suelos: “Estas se determinan según el lugar donde se lleve a cabo el proceso de descontaminación, las técnicas *ex situ* en la cual el suelo contaminado es llevado a un laboratorio donde se llevan a cabo los procesos necesarios para su tratamiento y las técnicas *in situ* donde el suelo es tratado en el lugar original. La técnica *in situ* posee un costo menor con relación a la *ex situ* pero necesita de largos periodos de tiempo para la limpieza.” (*Instituto Geominero de España “IGME”, 1996*). La técnica *ex situ* será la utilizada en el proyecto de investigación.

#### 4.3.1. Cuantificación de los Hidrocarburos:

La cuantificación de gasolina y diésel presentes en el suelo se realiza mediante métodos gravimétricos y métodos analíticos.

##### 4.3.1.1. Métodos analíticos:

Se utilizarán dos métodos analíticos para la cuantificación de hidrocarburos en las muestras, uno de ellos es el método de espectroscopia de infrarrojo - cuantitativo el cual evalúa la vibración que se da en el momento en que una molécula absorbe calor en la zona de infrarrojo del espectro electromagnético. Hay diferentes frecuencias de absorción en el infrarrojo, para los hidrocarburos se da mediante la absorción generada por los enlaces C-H entre 3200 a 2700  $\text{cm}^{-1}$ . Se debe contar con una curva de calibración de referencia y compararla con la obtenida en la muestra.

Si lo que se desea es obtener una mayor aproximación al compuesto (Hidrocarburo) que se encuentra en un suelo



contaminado, la cromatografía de gases - espectrometría de masas es el método indicado debido a que posee una gran sensibilidad con la capacidad de determinar cualquier clase de sustancias, el método se lleva a cabo mediante la inyección de la muestra en el cromatógrafo. Se regula la columna del cromatógrafo a una temperatura adecuada para separar analitos, estos son detectados por espectrometría de masas y luego comparados con una biblioteca incluida en el software del equipo para caracterizar e identificar los compuestos que se encuentran en el suelo de muestra. (Fernández, et al, 2006)

#### 4.3.1.2. Otros Métodos:

Existe otra clase de métodos para determinar hidrocarburos en una muestra de suelos, los métodos gravimétricos mediante asfaltenos insolubles en hexano y cuantificación de Hidrocarburos totales del petróleo.



#### 4.4. Marco Legal

Tabla 1. Normatividad Aplicable a Nivel Nacional

NORMA	SECCIÓN	ARTÍCULO	APLICACIÓN
<b>CONSTITUCIÓN POLÍTICA DE COLOMBIA 1991</b>	<b>CAPÍTULO 2.  DE LOS DERECHOS SOCIALES, ECONÓMICOS Y CULTURALES</b>	<b>Artículo 67.</b>	Proporcionar al ciudadano conocimientos por medio de la educación para proteger el medio ambiente.
	<b>CAPÍTULO 3.  DE LOS DERECHOS COLECTIVOS Y DEL AMBIENTE</b>	<b>Artículo 79.</b>	El derrame de hidrocarburos atenta contra la integridad del ambiente y es de vital importancia la acción del estado para su protección y conservación.
	<b>CAPÍTULO 5.  DE LOS DEBERES Y OBLIGACIONES</b>	<b>Artículo 95.</b>	Es nuestro deber proteger los recursos naturales que posee nuestro país, y cuidar el ambiente.
	<b>TITULO X  DE LOS ORGANISMOS DE CONTROL  CAPÍTULO 1. DE LA CONTRALORÍA GENERAL DE LA REPÚBLICA</b>	<b>Artículo 268.</b>	El saber en qué condiciones se encuentran los recursos naturales del país se pueden determinar las medidas ambientales para mejorar y promover el uso adecuado.
	<b>TITULO XII  DEL RÉGIMEN ECONÓMICO Y DE LA HACIENDA PÚBLICA.  CAPÍTULO 1.</b>	<b>Artículo 334</b>	El estado se encargará de velar por el uso razonable de los recursos naturales y uso de suelo, proporcionando un desarrollo económico de la mano del desarrollo sostenible.



	<b>DE LAS DISPOSICIONES GENERALES</b>		
	<b>CAPÍTULO 4.  DE LA DISTRIBUCIÓN DE RECURSOS Y DE LAS COMPETENCIAS.</b>	<b>Artículo 361.</b>	Mediante el Fondo Nacional de regalías, se brindará el apoyo económico para generar la protección del ambiente.
<b>LEY GENERAL AMBIENTAL DE COLOMBIA LEY 99 DE 1993</b>	<b>TÍTULO VIII  DE LAS LICENCIAS AMBIENTALES</b>	<b>Artículo 52.</b>	Las licencias ambientales requeridas para el manejo, uso, producción de los hidrocarburos serán otorgadas por el Ministerio de Medio Ambiente.
<b>NORMATIVIDAD AMBIENTAL SUELO</b>			
<b>DECRETO 1056 DE 1953 DEL MIN. DE MINAS</b>			Se implanta el Código de Petróleos
<b>DECRETO 1521 DE 1998 NIVEL NACIONAL</b>	<b>Generalidades</b>	<b>Artículo 1</b>	La manipulación de Combustibles líquidos, el manejo, el transporte y la distribución, son los principales causantes del derrame de estos si no se tiene el adecuado servicio
		<b>Artículo 8</b>	Las modificaciones que se presentan en una estación de servicio sin el adecuado seguimiento pueden ocasionar derrames y daños graves al ambiente.
		<b>Artículo 18 al 26</b>	La mala disposición de los tanques de almacenamiento puede ocasionar el vertimiento de combustibles al suelo



<b>DECRETO 321 DE 1999 NIVEL NACIONAL</b>			"Por el cual se adopta el Plan nacional de contingencia contra derrames de hidrocarburos, derivados y sustancias nocivas". Remítase a :http://www.alcaldiabogota.gov.co/sisjur/normas/Norma1.jsp?i=5272
<b>NORMATIVIDAD AMBIENTAL AIRE</b>			
<b>LEY 9 DE 1979</b>	<b>De las emisiones atmosféricas.</b>	<b>Artículo 49</b>	Prohibición del uso de combustibles en territorio nacional con un nivel de concentración tal, que pueda generar emisiones atmosféricas
<b>RESOLUCIÓN 160 DE 1996</b>		<b>Artículo 4</b>	Los hidrocarburos generados por fuentes móviles son uno de los contaminantes que más afecta la calidad del aire
<b>BACTERIAS</b>			
<b>Ley 101 de 1993</b>	<b>Ley General de Desarrollo Agropecuario y Pesquero</b>	<b>Artículo 65.</b>	Control del uso de insumos agropecuarios con relación al ICA
<b>DECRETO 1840 DE 1994</b>	<b>CAPÍTULO VI DEL CONTROL TÉCNICO DE LOS INSUMOS AGROPECUARIOS, MATERIAL GENÉTICO ANIMAL Y SEMILLAS PARA SIEMBRA.</b>	<b>Artículo 9</b>	El ICA responsable del control técnico de los insumos utilizados para la descontaminación del suelo (Bacterias).

Fuente: Autores del Proyecto, 2018





#### 4.5. Marco Tecnológico

En este marco se exponen los métodos analíticos usados para la cuantificación de los hidrocarburos.

##### 4.5.1. Métodos analíticos para la cuantificación de Hidrocarburos

La espectroscopia de infrarrojo es uno de los métodos analíticos más antiguos, se empieza a hablar de él en el año 1881 en el cual “Abney y Festing prepararon emulsiones fotográficas sensibles al infrarrojo cercano y fotografiaron el espectro de absorción de 48 líquidos orgánicos.” (B. Schrader, 1995), luego de nueve años en 1890, Julius “obtuvo el espectro infrarrojo de 20 compuestos orgánicos, encontrando que todos los compuestos que contienen metilo ( $\text{CH}_3$ ) exhiben una banda de absorción de  $3.45 \mu\text{m}$  y llegó a la conclusión de que la absorción de ‘ondas caloríficas’ se debe a movimientos intramoleculares; en otras palabras, la estructura interna de la molécula determina el tipo de absorción.” (Gómez & Murillo, 2015). Hoy en día se sigue utilizando el método debido a la efectividad y sencillez que posee en el momento de determinar compuestos orgánicos.

“El primer trabajo en el que se hace pasar una fase móvil gaseosa a través de una columna data de 1951, dando lugar a la técnica conocida como cromatografía de gases. Esta técnica, descrita por Martin y James en 1952, es en la actualidad en método usado ampliamente para la separación de los componentes volátiles y semivolátiles de una muestra. La combinación de altas resoluciones, sensibilidad y tiempos



de análisis cortos la ha convertido en una técnica de rutina usada en la mayoría de los laboratorios químicos.” (Gutiérrez & Droguet, 2002)



## 5. METODOLOGÍA

Este proyecto de investigación, tiene un enfoque mixto, cuantitativo y cualitativo en sus distintas fases; Cualitativo por los cambios físicos del suelo y la transformación del estado de los hidrocarburos a través de parámetros organolépticos y el enfoque cuantitativo debido a la cuantificación de las concentraciones de los hidrocarburos.

El proceso metodológico contó con cinco fases, que a continuación se describen:

**Primera fase Diagnostica:** es la búsqueda de información primaria y secundaria relacionada al tema de investigación (Libros, revistas, bases de datos de la biblioteca, entre otros).

**Segunda fase Desarrollo de Destrezas:** Se fundamenta en la aplicación del método de espectroscopia de infrarrojo; revisar el adecuado funcionamiento del equipo, los reactivos a utilizar y todo lo relacionado para una buena toma de datos.

**Tercera Fase Consecución y Cultivo de Cepas Bacterianas:** Adquisición, siembra, incorporación, adaptación y asimilación con el suelo de estudio.

**Cuarta Fase Diseño Experimental:** Planteamiento y desarrollo del diseño experimental, toma de muestras, patrón, réplicas de acuerdo con el combustible, la concentración y la cepa bacteriana, según la hipótesis que se ha planteado.

**Quinta Fase Análisis y Discusión de Resultados:** Procesamiento de resultados y elaboración de conclusiones, a partir de los datos obtenidos en cada una de las muestras con su respectiva cepa bacteriana y degradación natural.

Cada fase tiene una serie de actividades que serán desarrolladas a lo largo del proyecto de investigación. (Véase *tabla 2.*)



Tabla 2. Fases y actividades

FASE	ACTIVIDAD
Diagnóstica	<p>Búsqueda y recolección de la información primaria y secundaria.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Búsqueda de Artículos Científicos</li> <li>• Tesis de Grado</li> <li>• Páginas Web</li> </ul>
Desarrollo de destrezas	<p>Aplicación del método de espectroscopia infrarrojo</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Extracción de Hidrocarburos</li> <li>• Análisis de la degradación de los hidrocarburos</li> </ul>
Consecución y Cultivo de bacterias	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adquisición de las bacterias,</li> <li>• Cultivo de las cepas bacterianas.</li> <li>• Elaboración de los terrarios</li> <li>• Contaminación del Suelo</li> <li>• Incorporación de las Bacterias</li> </ul>
Diseño experimental	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Desarrollo de la experimentación en laboratorio</li> <li>• Toma de Muestras de Suelo Contaminado y Testigo.</li> <li>• Toma de Datos por espectrofotometría de Infrarrojo</li> </ul>
Análisis y Discusión de Resultados	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Procesamiento de los resultados</li> <li>• Análisis de los resultados</li> <li>• Elaboración de conclusiones.</li> <li>• Elaboración de recomendaciones</li> </ul>

Fuente: Autores del proyecto, 2018.

Inicialmente, se realizó una búsqueda de información acorde con el tipo de cepas bacterianas que se utilizarán en el proceso de degradación de hidrocarburos



(Gasolina y Diésel) y de esta manera se seleccionó las más indicadas para el desarrollo del proyecto.

Se diseñó un experimento que contó con seis terrarios de experimentación, los cuales tuvieron su debida bacteria y su contaminante (Gasolina o Diésel) de la siguiente manera:

Ilustración 1. Terrarios de experimentación



Fuente: Autores del proyecto, 2018.

De izquierda a derecha los terrarios fueron organizados y preparados de la siguiente forma:

Terrario 1: *Pseudomona putida* + Suelo contaminado con gasolina

Terrario 2: *Pseudomona putida* + Suelo contaminado con diésel

Terrario 3: *Acinetobacter baumannii* + Suelo contaminado con gasolina

Terrario 4: *Acinetobacter baumannii* + Suelo contaminado con diésel

Terrario 5: Suelo contaminado con Diésel

Terrario 6: Suelo contaminado con Gasolina.

Los terrarios 5 y 6 no contaron con cepa bacteriana con la finalidad de evaluar la posible degradación natural de los hidrocarburos. Cada terrario contuvo 3 kg de



suelo. Se contó con sus respectivas réplicas para un total de 18 terrarios para muestreo y análisis. Los terrarios fueron preparados con las siguientes características:

Tabla 3. Características de los terrarios

Característica	Cantidad
Suelo	3 kg
Hidrocarburo	0,15 Litros
Cepas	0,5 Litros

Fuente: Autores del Proyecto, 2018.

### 5.1 Pruebas Físico Químicas del Suelo

Se incluye un análisis del suelo, el cual es de vital importancia para garantizar el crecimiento bacteriano en el suelo y su actividad metabólica durante el proceso de biorremediación.

Para el análisis del suelo, se llevó a cabo el estudio de los siguientes parámetros:

**pH:** El pH es un parámetro importante que se estudió a lo largo del proyecto de investigación, puesto que un valor inadecuado de pH en el suelo impediría el desarrollo de los microorganismos degradadores. Para que dichos microorganismos se desarrollen de manera adecuada, se debía tener un valor entre 6 – 8 unidades.

**Humedad:** La humedad juega un valor fundamental, si no se tienen los valores adecuados de humedad, se verá afectado el intercambio gaseoso además de que se pueden generar zonas con baja actividad de degradación.



Valores de humedad entre 25 % - 70% de la capacidad de campo son óptimos para la biorremediación.

**Temperatura:** La temperatura puede aumentar o inhibir el proceso de degradación, debido a que este parámetro es esencial para el metabolismo de los microorganismos degradadores, además, de que puede llegar a modificar la composición química de los hidrocarburos. Temperatura óptima 15 °C - 45 °C. La efectividad de las bacterias aumenta entre más elevada esté la temperatura sin exceder su rango.

**Disponibilidad de Oxígeno:** El oxígeno requerido para el proceso de biorremediación se proporcionó mediante volteo manual de los distintos terrarios de experimentación tres días a la semana, los días Lunes, miércoles, viernes y sábado en caso de que se modificarán los horarios por días no hábiles.



## 5.2 Inoculación de las Bacterias

Para el análisis de las muestras líquidas extraídas por Agitación-centrifugación y extracción Soxhlet se comprobó que cualquiera de los dos métodos es completamente funcional y teniendo en cuenta que el tiempo de extracción para el soxhlet es mucho mayor se optó por realizar las extracciones por el método de agitación-centrifugación para los respectivos análisis cuantitativos.

Se utilizaron dos cepas bacterianas, *Pseudomona putida* y *Acinetobacter baumannii* las cuales fueron inoculadas mediante estriado simple en agar sangre selectivo por un periodo de 24-36 horas a una temperatura de 35 °C.

Las bacterias utilizadas se obtuvieron del laboratorio Annar diagnóstica import, en presentaciones kwik – stik plus, con sus respectivas indicaciones y características, se encontraban encapsuladas, y no se requirió uso de asas para inoculación puesto que cada unidad kwik – stik contiene una pastilla liofilizada de una única cepa de microorganismo, un depósito de líquido hidratante y un hisopo inoculador que facilita el proceso de inoculación, al reemplazar el asa por un hisopo; se utilizaron los diferentes elementos de protección personal, como lo fueron los guantes de nitrilo, tapabocas y bata, para evitar una posible contaminación con las bacterias y protegerlas de interferencias en el momento de la siembra y cultivo.



## Ilustración 2. Inoculación de bacterias



Fuente: Autores del proyecto, 2018.

El medio de cultivo utilizado es un agar sangre selectivo para el crecimiento microbiano de las cepas bacterianas a utilizar, el cual cuenta con un pH de 7,2 siendo un valor óptimo para su desarrollo.

Con el fin de garantizar una adecuada inoculación de los microorganismos degradadores, se esterilizó el ambiente de trabajo mediante una cámara de flujo laminar para impedir la proliferación de otro tipo de microorganismos en el agar.

### 5.3 Siembra de las Bacterias en el Suelo:

La siembra de las bacterias en el suelo se realizó mediante dilución de agua peptonada y el inóculo bacteriano, en una proporción de 450 ml y 50 ml respectivamente para un total de 500 mL de cepa bacteriana en el suelo para el proceso de biorremediación.

### 5.4 Contaminación de Suelo o Terrarios de Experimentación:

El suelo se contaminó en los laboratorios de la Universidad Libre con Diésel o Gasolina según correspondía, en una proporción de 150 mL de contaminante por



cada terrario de experimentación, es decir que por cada 1 kilogramo de suelo se usaron 50 mL del hidrocarburo.

### **5.5 Análisis de la Degradación de los Hidrocarburos:**

Para evaluar la degradación de los hidrocarburos, se utilizó el espectrofotómetro de infrarrojo FTIR marca AGILENT con el que cuenta el laboratorio de análisis instrumental de la Universidad Libre.

#### **5.5.1 Recuperación de Hidrocarburos en el Suelo:**

Previo al análisis realizado por espectrofotometría infrarrojo, se extrajeron los hidrocarburos presentes en el suelo contaminado mediante dos métodos:

#### **5.5.2 Extracción Soxhlet:**

Se utilizó el método de reflujo con equipo soxhlet usando como solvente el Diclorometano, para lo cual se tomaron 8 gramos de suelo seco y sulfato de sodio anhidro en una relación 1:1 suelo:sulfato en un dedal para equipo soxhlet. Se adicionaron 125 ml de Diclorometano en cada matraz. Se ensambló el equipo soxhlet a una temperatura de 45° C y durante 8 horas.

Ilustración 3. Extracción Soxhlet de Hidrocarburos en Muestras de Suelo



Fuente: Autores del Proyecto, 2018.

#### 5.5.3 Extracción Agitación/Centrifugación:

Para validar el método de reflujo soxhlet se utilizó el método de agitación-centrifugación usando tubos para centrífuga de 15 ml, para lo cual se colocó 1 g de suelo seco y al cual se le adicionaron 3 g de sulfato de sodio anhidro y se agitó en vórtex hasta homogeneizar. Luego se le adiciono a cada vial 5 ml de Diclorometano y se llevó nuevamente al vórtex durante 45 segundos, incorporando bien el solvente con el suelo. Las muestras fueron centrifugadas a 6000 rpm durante 10 minutos, luego se retiró el sobrenadante y se colocó en un matraz. Se lavó el suelo en dos ocasiones más sobre el residuo sólido remanente hasta lograr un volumen de aproximadamente 15 ml de sobrenadante. Las muestras fueron almacenadas a 5°C para su análisis posterior.

#### 5.5.4 Espectrofotometría Infrarrojo:

Después de la extracción de los hidrocarburos contenidos en las muestras de suelo, se sometieron a espectrofotometría infrarroja en un espectrofotómetro FTIR,



mezclando la muestra de suelo con Bromuro de Potasio (KBr) para el análisis cualitativo en estado sólido y para las muestras extraídas un análisis cuantitativo en estado líquido, se usó como disolvente el Diclorometano, siendo este también usado como blanco para la creación de las curvas de calibración necesarias y así obtener los resultados requeridos por el proyecto.

### **5.6 Análisis de Datos:**

Se determinó la capacidad de degradación de las cepas bacterianas, mediante comparación de los resultados obtenidos en los muestreos realizados, un muestreo de condiciones iniciales y un muestreo final, donde se pudo evidenciar la degradación comparando los muestreos, de esta manera se logró determinar qué cepa bacteriana posee mejores capacidades para la degradación de los hidrocarburos o si fue la biorremediación natural del suelo la mejor opción. Todos los muestreos se hicieron con tres repeticiones para garantizar una adecuada toma de datos.



## 6. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Con la finalidad de obtener una biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos mediante la utilización de cepas bacterianas, se realizó una investigación *ex situ* en los laboratorios de suelos, microbiología y análisis instrumental de la Universidad Libre, bajo las condiciones necesarias para que dicha investigación se llevase a cabo, por ende, se exponen a continuación los resultados obtenidos y la discusión de dichos datos.

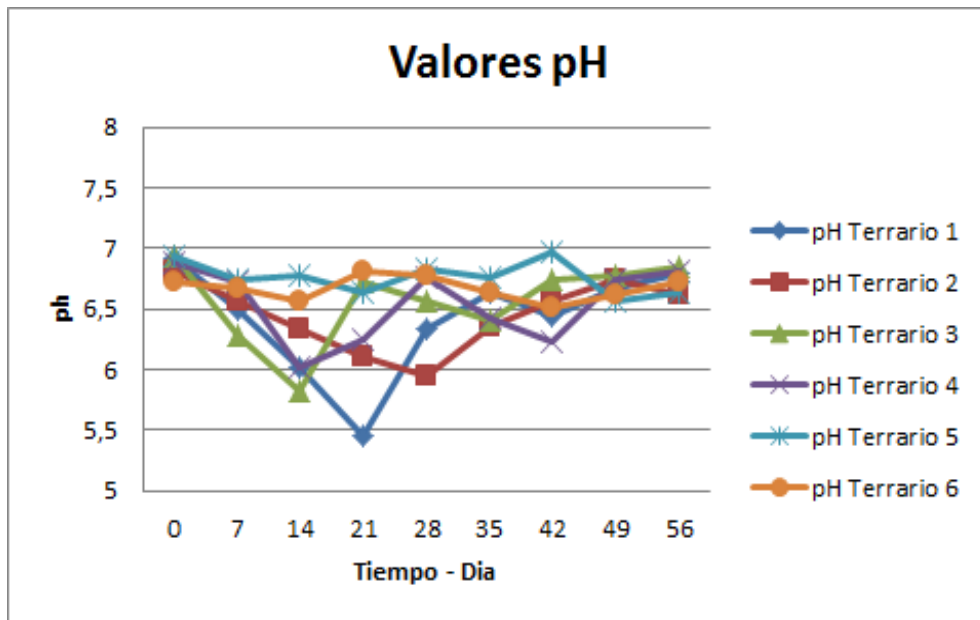
### 6.1. Análisis de suelo:

Con la finalidad de garantizar el crecimiento microbiano y la asimilación de las bacterias en las condiciones adecuadas para la degradación de los hidrocarburos durante el tiempo de experimentación, se realizaron análisis del suelo a lo largo del desarrollo del proyecto. Dentro de este análisis, se dio seguimiento al pH, a la temperatura y a la humedad

#### 6.1.1 Análisis de ph:

Los valores de ph obtenidos durante el desarrollo de la investigación se pueden observar en la *gráfica 1*.

Gráfica 1. Valores de pH



Fuente: Autores del proyecto, 2018

Puede observarse que los valores de pH tuvieron leves fluctuaciones a lo largo de la investigación, estos cambios de pH en el suelo se debe a la actividad microbiana. Los valores obtenidos no muestran un cambio considerable o que pudiera haber afectado el proceso de biorremediación a lo largo de la investigación.

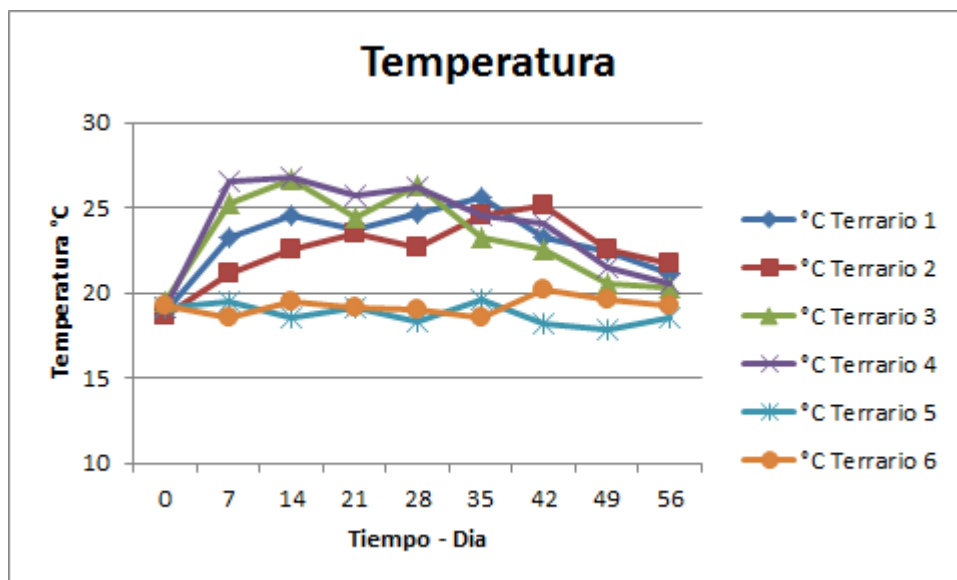
Desde el inicio del proyecto los terrarios de experimentación 1, 2, 3 y 4 con las bacterias utilizadas se encuentran en el proceso de biorremediación con un pH que oscila de 6.5 a 5.5 mientras que los terrarios sin bacterias no muestran un cambio significativo en el pH, luego del día 49 el pH tiende a estabilizarse por la baja actividad microbiana.



### 6.1.2 Análisis Temperatura

La temperatura del suelo dentro de los terrarios se tomó cada 7 días durante el tiempo de experimentación, los valores obtenidos se tabularon y se pueden observar en la *gráfica 2*.

*Gráfica 2. Temperatura*



Fuente: Autores del proyecto, 2018

En el día 7 se puede evidenciar un aumento de temperatura considerable en los terrarios 1, 2, 3 y 4 puesto que estos son los que tienen cepa bacteriana, esto debido a la actividad microbiana que presenta cada terrario y por ende al proceso de biorremediación que se estaba llevando a cabo. A partir del día 42, la temperatura fue descendiendo debido a la baja actividad microbiana puesto que las bacterias fueron degradando los hidrocarburos y así agotando su fuente de carbón.

De acuerdo con estos parámetros, el suelo presenta unas características óptimas para el proceso de degradación con bacterias en cuanto a temperatura y pH, la temperatura se encuentra dentro del rango óptimo 18 a



30°C, promediando los valores de los pH obtenidos se encuentra dentro de los rangos establecidos para una correcta biodegradación de los hidrocarburos, estos valores son adecuados para el crecimiento de las bacterias y el funcionamiento metabólico de las mismas; la humedad como factor de importancia al igual que el pH y la temperatura, se encuentra entre el orden del 34% haciendo el análisis con suelo secado al aire, siendo este valor adecuado para la biorremediación.

Para mantener el porcentaje de humedad entre el rango admisible para una óptima biorremediación, se realizó un riego manual cada semana y que así no se afectara la eficiencia de las bacterias ni la degradación natural de los hidrocarburos presentes en el suelo de cada terrario.

Además de un requerimiento de oxígeno que fue proporcionado por medio de volteo manual, tres días por semana para garantizar un ambiente aerobio, que es de gran importancia para la actividad microbiana manipulada en este proyecto.

## **6.2. Inoculación de las Bacterias:**

El crecimiento bacteriano fue el esperado gracias al agar sangre utilizado. Se evidencia un alto desarrollo de microorganismos degradadores puesto que la temperatura ambiente es la indicada para su crecimiento, dichas bacterias posteriormente fueron cultivadas en el suelo contaminado con hidrocarburos. El nutriente utilizado (Agar Sangre), presenta unas características apropiadas como medio de cultivo para el crecimiento de las bacterias. Según los monitoreos realizados se ha observado que las bacterias han mostrado un alto índice de crecimiento a una temperatura aproximada a los 35°C, siendo

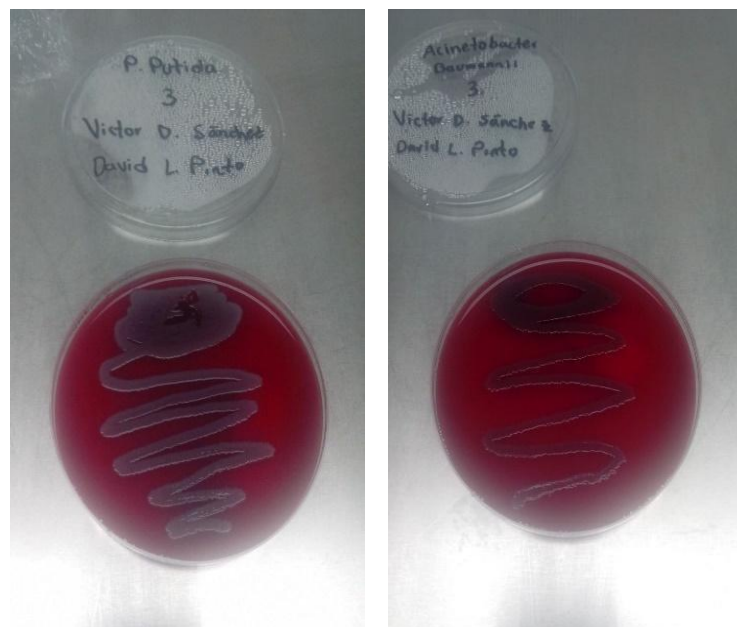




bastante notoria la diferencia entre el primer monitoreo y el segundo. Las bacterias presentan un olor fuerte, amargo y desagradable debido a la interacción de las bacterias con el medio de cultivo, dando como indicador dicho olor, este nos indica que las bacterias se están alimentando adecuadamente y reproduciéndose de la misma forma.

Luego de inoculadas las bacterias, se realizan monitoreos para evaluar el crecimiento bacteriano a 18 horas y a 24 horas.

Ilustración 4. Monitoreo a 18 horas



Fuente: Autores del proyecto, 2018.



En la *ilustración 4* se puede detallar el crecimiento microbiano en el agar sangre por medio del color, el olor y la forma que se forma luego del tiempo transcurrido el cual es de manera esperada, logrando de esta forma una buena inoculación de bacterias y evidenciando lo anteriormente planteado.

Ilustración 5. Monitoreo a 24 horas



Fuente: Autores del proyecto, 2016.

En el segundo monitoreo transcurridas las 24 horas de inoculadas las bacterias, se puede observar un amplio esparcimiento de los agentes microbianos en el agar sangre, demostrando así, el crecimiento bacteriano de manera eficiente.

### 6.3. Preparación de los Terrarios:

Para la preparación de los terrarios, se tuvo en cuenta la cantidad de suelo, la cantidad de Hidrocarburo derramado (Gasolina y Diésel) y la cantidad de Cepas Bacterianas cultivadas en los mismos.



Para efectos del proyecto se determinó que la cantidad de suelo en cada terrario sería de 3 Kg en cada uno. Para el análisis de los terrarios fueron preparados teniendo en cuenta que los suelos no se saturaran del hidrocarburo y este fuera el óptimo para que las bacterias sobrevivieran y pudiesen alimentarse del hidrocarburo adecuadamente.

#### **6.4. Análisis por Medio de Espectrofotómetro Infrarrojo:**

En el siguiente capítulo se observarán los pictogramas obtenidos por medio de la espectroscopía infrarroja del suelo sin contaminar tomando este como referencia y como meta de remediación del suelo, y de los ya preparados previamente con el diésel y la gasolina.

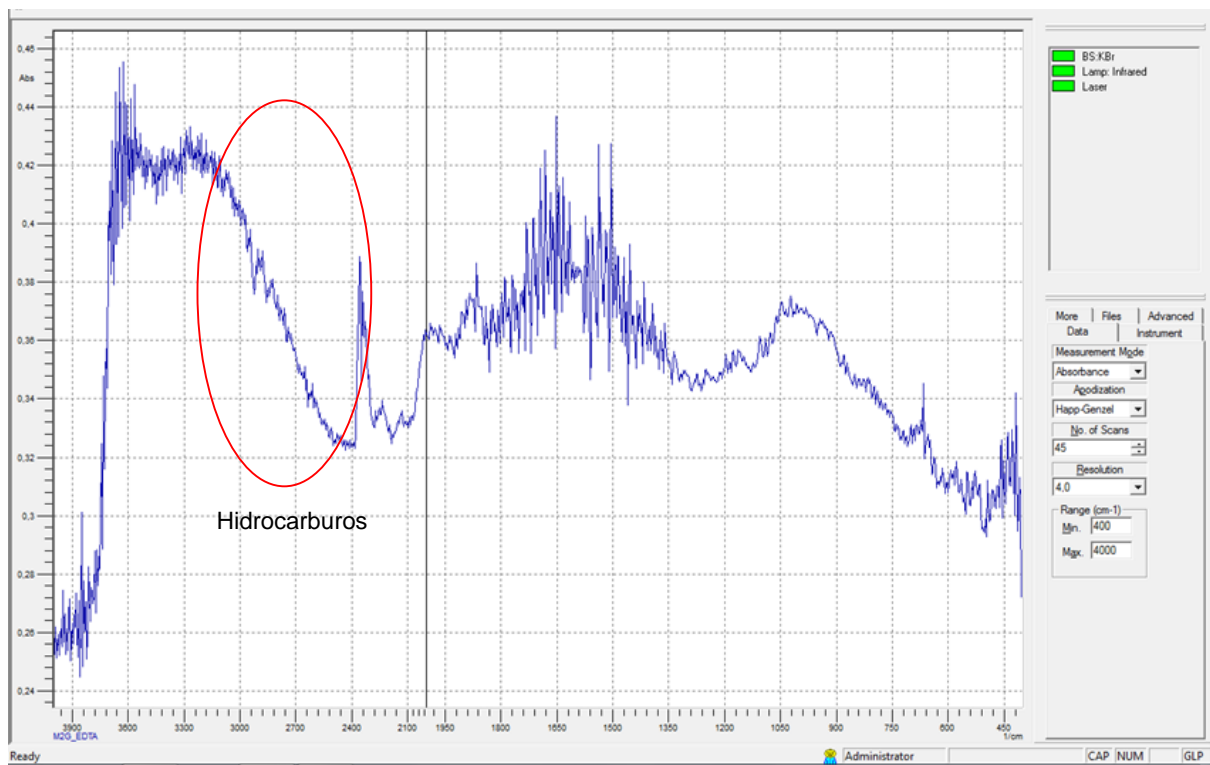
##### **6.4.1 Análisis Cualitativo de la Degradación de Hidrocarburos**

El análisis de la muestra en el equipo en esta ocasión se realizó estando en estado sólido con el fin de identificar el cambio que se efectúa en el suelo al agregarse los hidrocarburos a los terrarios.

##### **Muestra de suelo sin contaminar + KBr.**

El análisis de la muestra de suelo sin contaminar es el punto de partida para la comparación y la evaluación de la degradación de los hidrocarburos con los cuales fue contaminado el suelo. Este será el objetivo al que se pretende llevar el suelo contaminado después de realizada la biorremediación.

Gráfica 3. Suelo sin contaminar + KBr



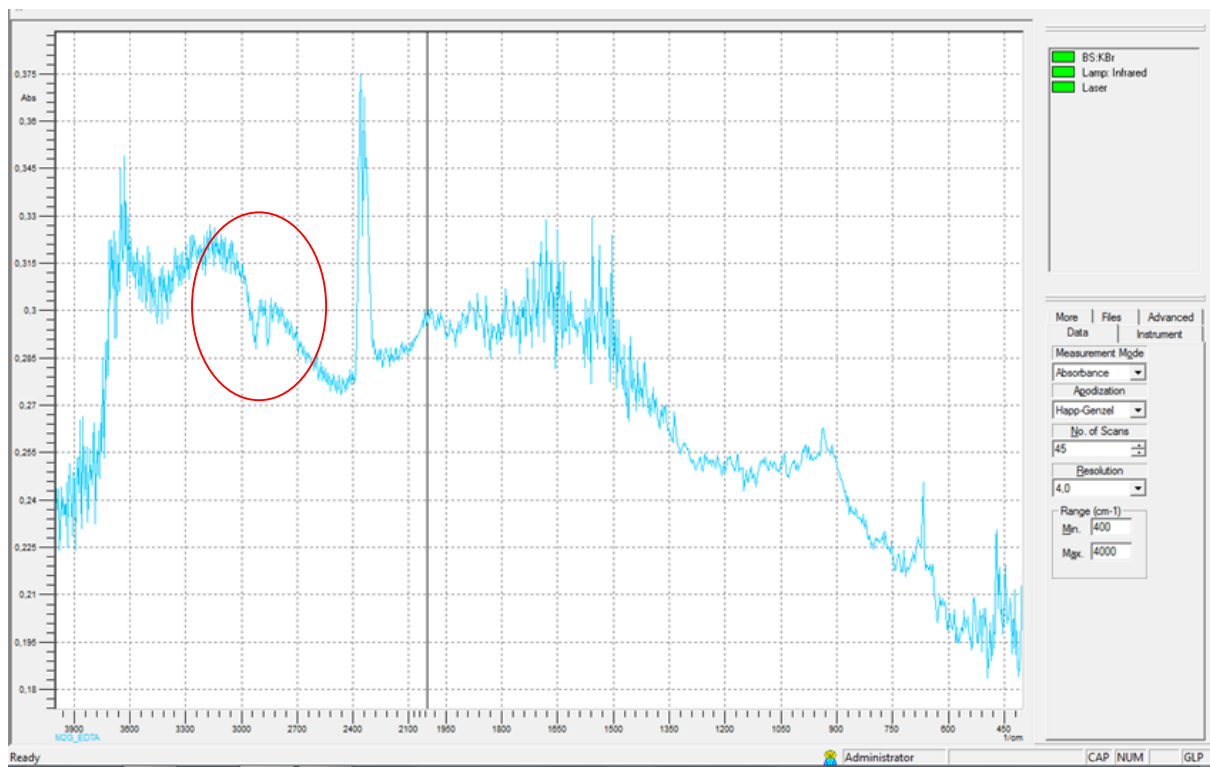
Fuente: Autores del Proyecto, 2018

El suelo sin contaminar no presentó grandes picos en los rangos comprendidos entre los 2700 cm<sup>-1</sup> y los 3200 cm<sup>-1</sup>, frecuencias de absorción en el infrarrojo, para los hidrocarburos; evidenciando de esta manera un suelo sin contaminación por dichos hidrocarburos.

#### - **Muestra de suelo contaminado con gasolina + KBr**

La gasolina cuenta con gran cantidad de hidrocarburos dentro de su composición, entre ellos, alcanos, alquenos, cicloalcanos y aromáticos. Los cuales son característicos en picos comprendidos entre los 2800 cm<sup>-1</sup> de frecuencia de absorción.

Gráfica 4. Suelo contaminado con Gasolina + KBr



Fuente: Autores del proyecto, 2018

Como se observó en la *gráfica 4*, se evidenció un incremento en comparación al suelo no contaminado entre los rangos de frecuencia de absorción de 3200  $\text{cm}^{-1}$  y los 2700  $\text{cm}^{-1}$ , siendo este incremento ocasionado por la presencia del hidrocarburo, para este caso la gasolina, en el suelo. También se tuvieron en cuenta la aparición de otros picos fuera del rango mencionado anteriormente debido a la interacción química que pudo existir con los demás compuestos con los que contaba el suelo antes de ser contaminado con el hidrocarburo.

En la réplica 2 se logró observar algo similar a la réplica 1 cambiando los índices de absorbancia presente en el suelo, aun así, sigue evidenciándose la presencia del hidrocarburo dentro de las frecuencias de absorción en el infrarrojo siendo este un indicador de gran importancia para la identificación

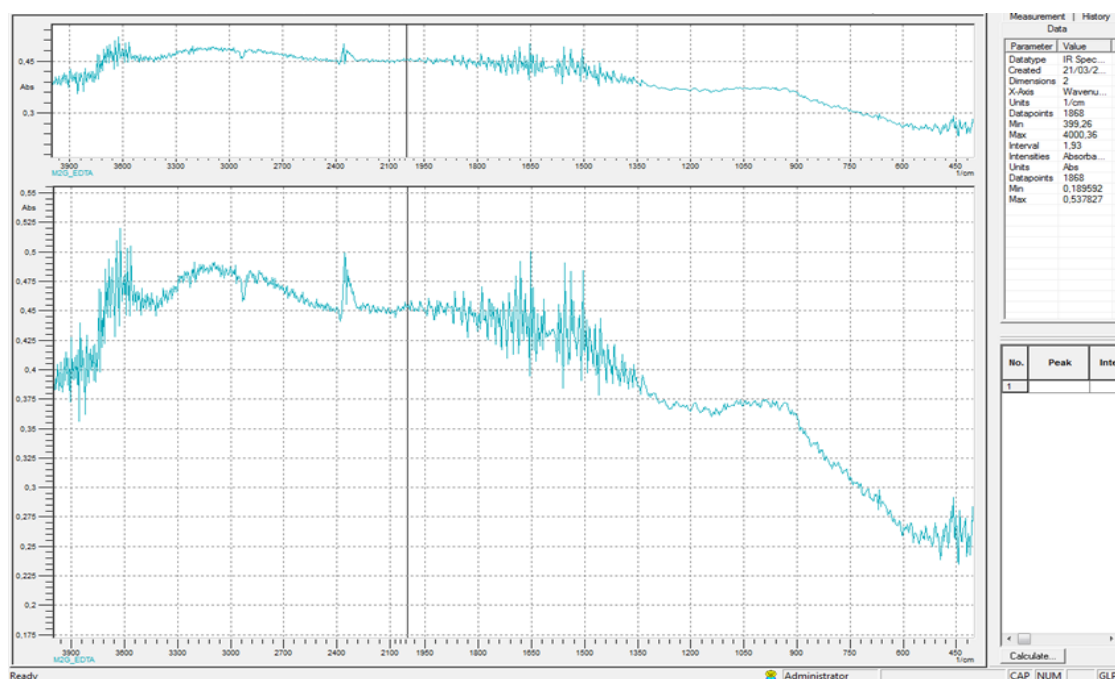


del compuesto. Se muestra el mismo comportamiento cambiando levemente en la absorbancia producida por los compuestos y la cantidad, este cambio en las absorbancias que hemos evidenciado en cada una de las réplicas se debe a la concentración del hidrocarburo en cada una de las muestras tomadas. Esto confirmado de acuerdo a la Ley de Beer la cual dice que la absorbancia es directamente proporcional a concentración de un compuesto.

#### - Muestra de suelo contaminado con diésel + KBr

Tal y como se puede notar en la gráfica 7, el suelo contaminado con diésel presentó los valores de absorbancia más elevados de los 3 suelos, esto es de acuerdo a que el diésel posee cadenas de carbono más largas que los de la gasolina y presenta una mayor cantidad de componentes dentro de las frecuencias de absorción en el infrarrojo, comprendidas entre los 3200  $\text{cm}^{-1}$  y los 2700  $\text{cm}^{-1}$ .

Gráfica 5. Suelo contaminado con Diésel + KBr



Fuente: Autores del proyecto, 2018



A diferencia de la gasolina este compuesto derivado del petróleo muestra descensos más pronunciados en las longitudes de onda menores a los  $800\text{ cm}^{-1}$  como se logra observar, estos pictogramas presentan una mayor estabilidad en los rangos comprendidos entre los  $3200\text{ cm}^{-1}$  y los  $2700\text{ cm}^{-1}$  de acuerdo a la concentración del hidrocarburo.

#### 6.4.2 Análisis Cuantitativo de la Degradación de Hidrocarburos

Para el análisis cuantitativo de las muestras, se elaboraron dos curvas de calibración, la primera curva de calibración es la concerniente al análisis de las muestras que contenían diesel mientras que la segunda curva se elaboró para las muestras con gasolina.

Las curvas de calibración fueron realizadas con el objetivo de determinar la degradación de los contaminantes de estudio, previo a estas curvas de calibración, se realizaron curvas de calibración específicas para cuantificar hidrocarburos totales de petróleo, con muestras de suelo contaminado por crudo, pero no fueron las indicadas para nuestro estudio. Por este motivo, se realizaron las siguientes curvas de calibración:

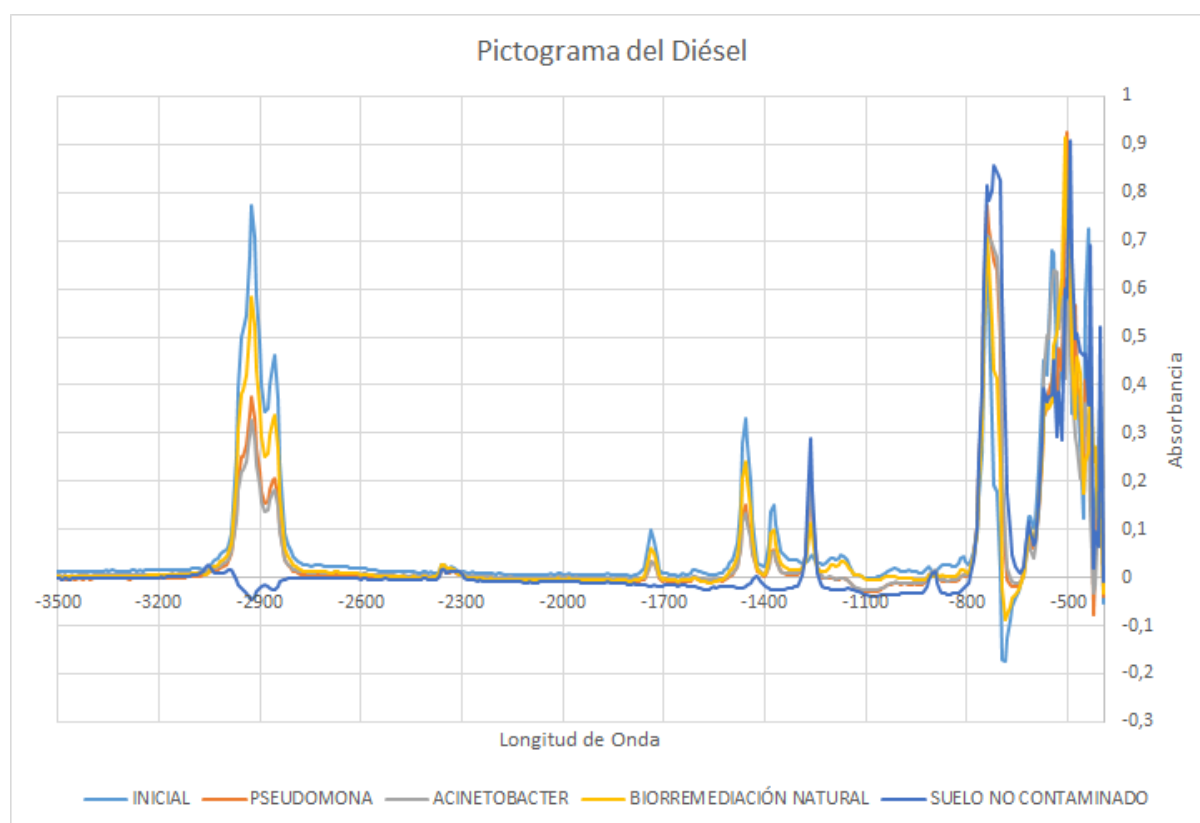
La elaboración de la curva de calibración para el Diésel con Diclorometano se realizó con las diluciones en proporciones de 0:1, 2.5:7.5, 5:5, 7.5:2.5 y 1:0 respectivamente. Se evidenció cómo, de acuerdo a las distintas concentraciones se dibuja la misma figura pero con diferente absorbancia, en los rangos donde se ubican los hidrocarburos, así como se plantea en la ley de Beer. (Ver Anexos)





Para evaluar el proceso de biorremediación y dar cumplimiento al primer objetivo, es primordial enfocarse en los picos comprendidos entre los  $-3200\text{ cm}^{-1}$  a  $-2600\text{ cm}^{-1}$ , puesto que en esta zona del espectro es donde se detallan los hidrocarburos analizados.

Gráfica 6. Pictograma del Diésel



Fuente: Autores del proyecto, 2018.

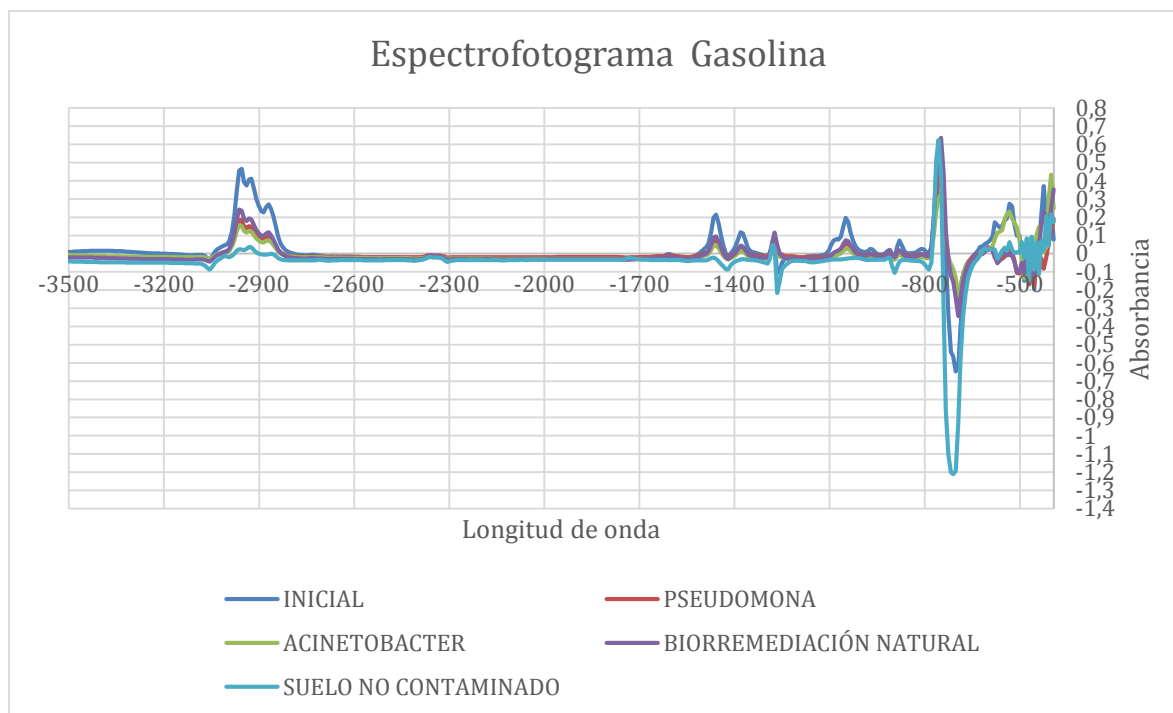
En el anterior Pictograma (Gráfica 6) como se mencionó anteriormente, en la región de los  $-3200$  a  $-2600\text{ cm}^{-1}$  se evidencia una condición inicial del suelo contaminado con Diésel, una biorremediación natural, la degradación de las bacterias utilizadas y el suelo sin contaminar. Se pudo observar una baja biodegradación del diésel debido a su baja tasa de evaporación con relación a la gasolina, viéndose una degradación natural del 24,68% del diésel en el suelo. La bacteria que logró un mayor porcentaje de degradación fue la *Acinetobacter baumannii* con un 57,14% de





reducción, mientras que la *Pseudomona putida* presentó un porcentaje de reducción del 51,94%.

Gráfica 7. Espectrofotograma de la Gasolina



Fuente: Autores del proyecto, 2018.

En el espectrofotograma se puede observar, la degradación tanto natural como por acción de las bacterias utilizadas, se refleja las condiciones iniciales de los terrarios de experimentación contaminados con gasolina, una biorremediación natural debido a que la gasolina puede mediante otros procesos físico-químicos adicionales, evaporarse de manera que disminuya su concentración (Franzmann et al., 2002). Según lo planteado en el segundo objetivo, la bacteria *Acinetobacter baumannii* presentó mayor porcentaje de degradación a comparación de la Bacteria *Pseudomona putida*, y está a su vez mostró un mayor porcentaje de degradación que la biorremediación natural. Se encuentra un estado inicial del suelo sin



contaminar, que es el punto de comparación o el punto al cual se espera llegar llevando a cabo el proceso de biorremediación.

En el suelo contaminado con Gasolina y que presentaba la bacteria *Pseudomona putida* se logró una biorremediación del 63,27% en 60 días de experimentación. En el suelo contaminado con Gasolina y que presentaba la *Acinetobacter baumannii* presentó una biorremediación del 69,38% en 60 días de experimentación, en cuanto a la biorremediación natural del suelo con la gasolina este fue de tan solo 51,02%.

### **6.5 Análisis de Eficiencia de las Cepas Bacterianas Usadas:**

El tercer objetivo se desarrolló con el análisis basado en los porcentajes mostrados anteriormente en los casos de ambos combustibles, se evidenció una clara y mayor eficiencia en la bacteria *A. baumannii* ya que presentó porcentajes más grandes que la *P. putida* y la biorremediación natural a la hora de degradar los hidrocarburos en cada terrario donde esta fue cultivada, esto debido a que la *A. baumannii* metaboliza mucho más rápido los hidrocarburos de cadenas largas y hace que estos se reduzcan en gran medida a otro tipo de hidrocarburos.

La *P. putida* es una bacteria que demora un poco más en degradar las cadenas largas porque metaboliza cadenas más cortas hasta que las hace admisibles para su degradación.

Por parte de la biorremediación natural se observó que tan solo fue de un 24,68% en el caso del Diesel y 51,02% en la gasolina. Esto es una evidencia de que efectivamente las bacterias si funcionan como agente degradador de los hidrocarburos y aceleran el proceso de asimilación del suelo para estos combustibles. Para el caso de la gasolina influyen otros aspectos del combustible



como su volatilidad alta y por esto es mucho mayor su degradación natural, pues estamos hablando que es un poco más del doble que en el caso del Diésel.



## 7. CONCLUSIONES

- ✓ Se validaron las condiciones óptimas del suelo para el crecimiento microbiano y el desarrollo del proceso de biorremediación, teniendo unos valores acordes a los rangos estipulados en investigaciones previas, en cuanto a temperatura, pH, humedad y oxígeno.
- ✓ Mediante el análisis cualitativo con espectrofotómetro infrarrojo se demostró un incremento de la absorbancia en las bandas que comprenden la región de 3200  $\text{cm}^{-1}$  a 2700  $\text{cm}^{-1}$ , recalcando de esta manera la contaminación con hidrocarburos en el suelo, y de esta manera se comprueba que hubo un cambio en las condiciones iniciales del suelo de acuerdo con los pictogramas.
- ✓ Se pudo evidenciar que las cepas escogidas para el desarrollo del proyecto fueron capaces de metabolizar más rápidamente los hidrocarburos en comparación de una degradación natural del suelo según los pictogramas obtenidos.
- ✓ Para el análisis de las muestras líquidas extraídas por Agitación-centrifugación y extracción Soxhlet se comprobó que cualquiera de los dos métodos son adecuados, sin embargo el tiempo de extracción para el soxhlet es mucho mayor, por lo cual se optó por utilizar el método de agitación- centrifugación.



- ✓ Se determina que la bacteria con mayor efectividad a la hora de degradar los hidrocarburos propuestos, siendo estos el Diesel y la Gasolina, es la bacteria *A. baumannii*, gracias a su buena metabolización de las cadenas largas de hidrocarburos.
  
- ✓ Se evidenció que ambas cepas bacterianas son funcionales como agentes degradadores de los hidrocarburos, se llega a esta conclusión al realizar la comparación entre los porcentajes de degradación natural del hidrocarburo y el comportamiento de cada una de las bacterias en cada terrario.
  
- ✓ Este método de biorremediación es aplicable en cualquier tipo de suelo contaminado siempre y cuando cumpla con las condiciones de los parámetros físico-químicos del suelo para garantizar la adecuada actividad microbiana (pH: 6-8, Temperatura: 15°C-45°C, Humedad: 25-70%.)

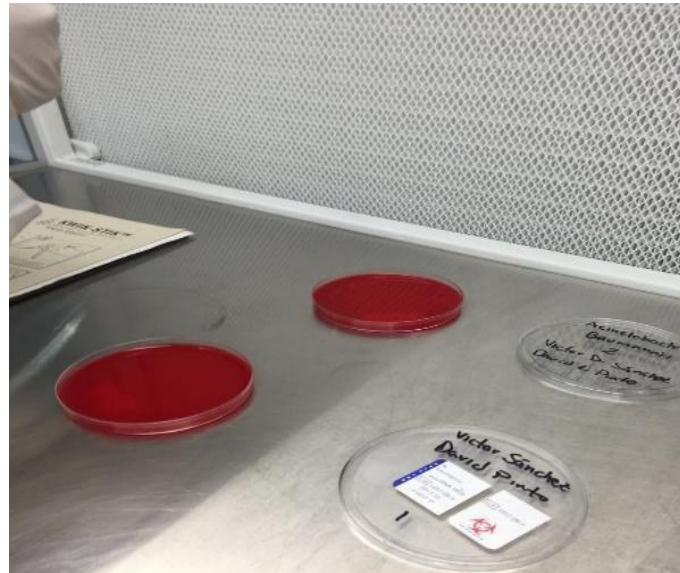


## RECOMENDACIONES

- Para llevar a cabo procesos de biorremediación más cortos, se recomienda utilizar los nutrientes necesarios (bioestimulación) Carbono, Nitrógeno, Fosforo en relación 100:10:1, complementando de esta manera un proceso de bioaumentación con bacterias exógenas o modificadas genéticamente para llevar a cabo dicho proceso.
- Con la finalidad de obtener resultados más precisos en cuanto a la degradación de cada hidrocarburo, se recomienda realizar un análisis utilizando el cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas. Cabe resaltar que se debe tener claridad en el uso del equipo, entre ello, el método a utilizar, la columna cromatográfica y las condiciones de trabajo del equipo. Para este tipo de investigación se recomienda el uso del método de Cuantificación de hidrocarburos en suelos con una columna HP5-ms.
- Se recomienda que a la hora de seleccionar las bacterias para la degradación de los hidrocarburos teniendo en cuenta la volatilidad de algunos hidrocarburos, como en el caso de la gasolina, se observen las características de cada bacteria pues es fundamental trabajar con cepas capaces de metabolizar rápidamente los compuestos volátiles antes de que estos escapen y formen el smog.
- Se recomienda mantener extremo cuidado con las propiedades físicas y químicas del suelo (humedad, temperatura, pH), para la supervivencia de las bacterias cultivadas y una correcta degradación de los hidrocarburos.

## 8. ANEXOS

### Anexo 1. Agar Sangre



Fuente: Autores del proyecto, 2018.

### Anexo 2. Cepas Bacterianas



Fuente: Autores del proyecto, 2018

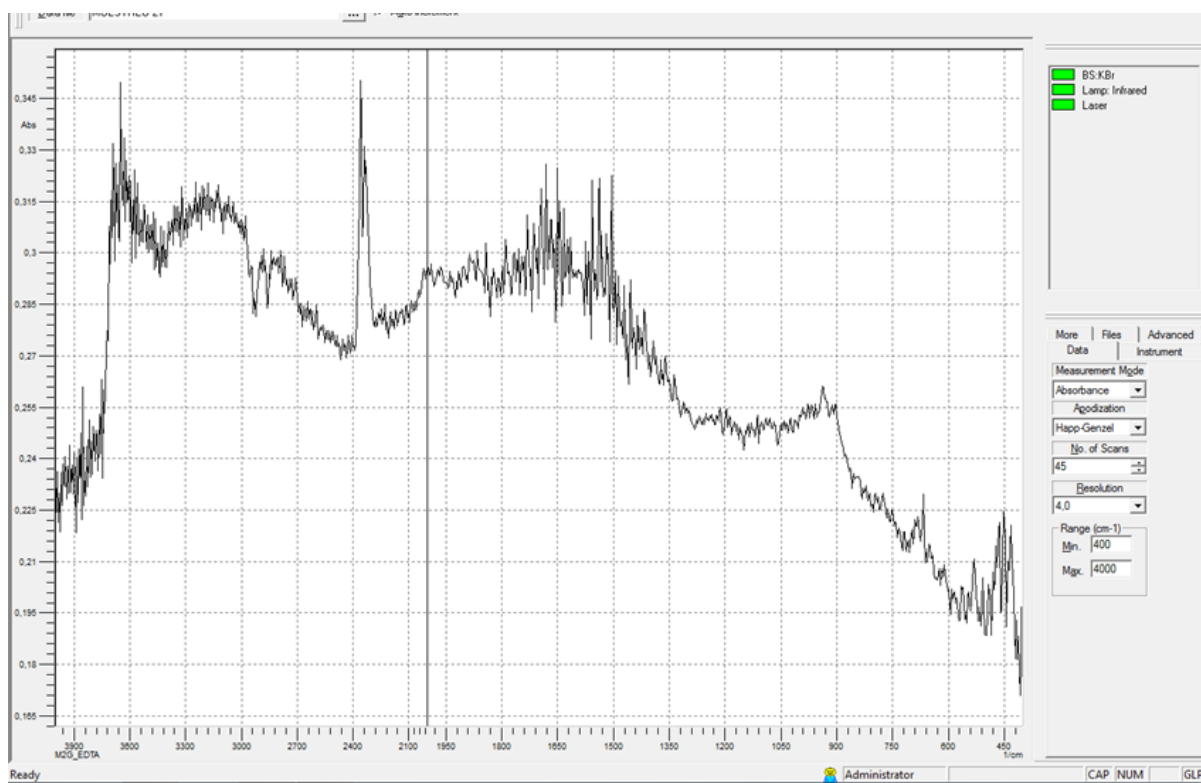


### Anexo 3. Esterilización del ambiente



Fuente: Autores del proyecto, 2018.

### Anexo 4. Suelo contaminado con Gasolina + KBr Réplica 2

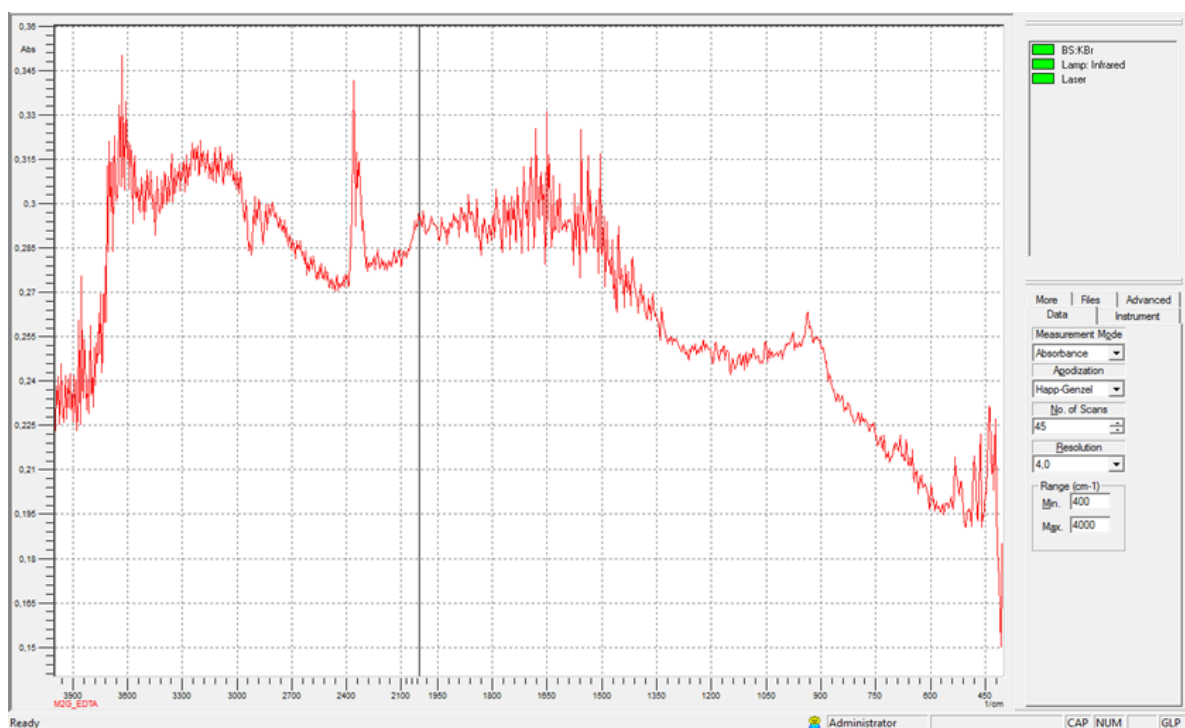


Fuente: Autores del proyecto, 2018.



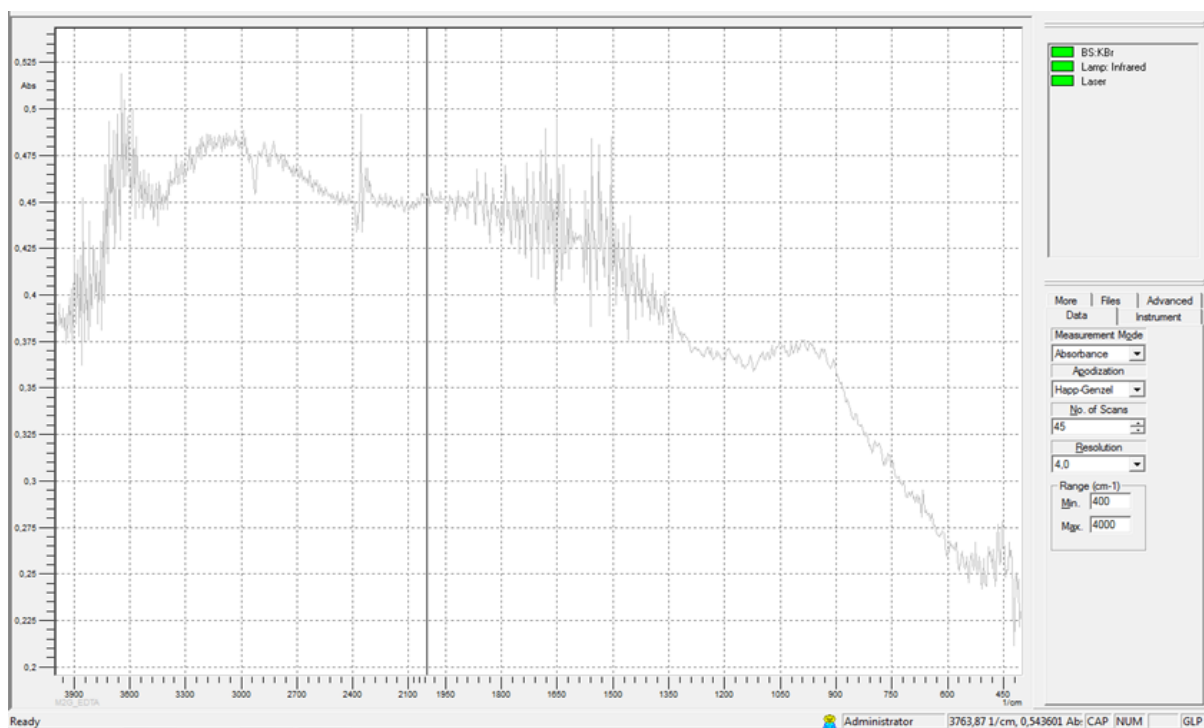


## Anexo 5. Suelo contaminado con Gasolina + KBr Réplica 3



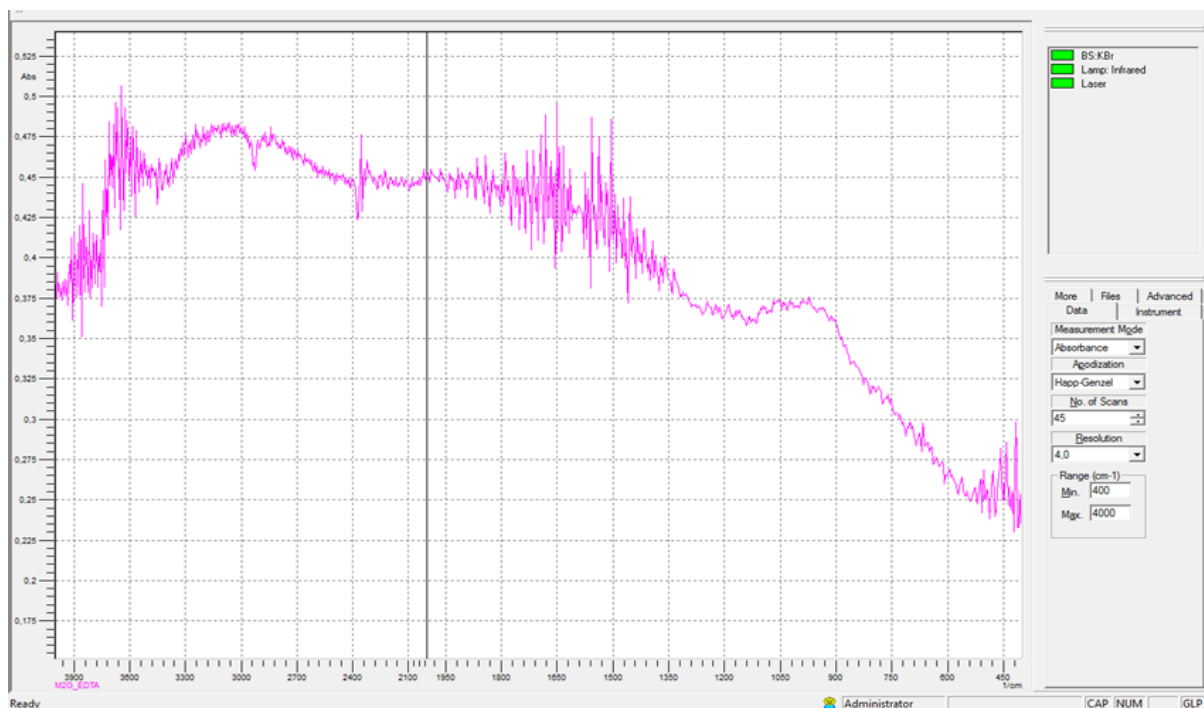
Fuente: Autores del proyecto, 2018.

## Anexo 6. Suelo contaminado con Diesel + KBr Réplica 2



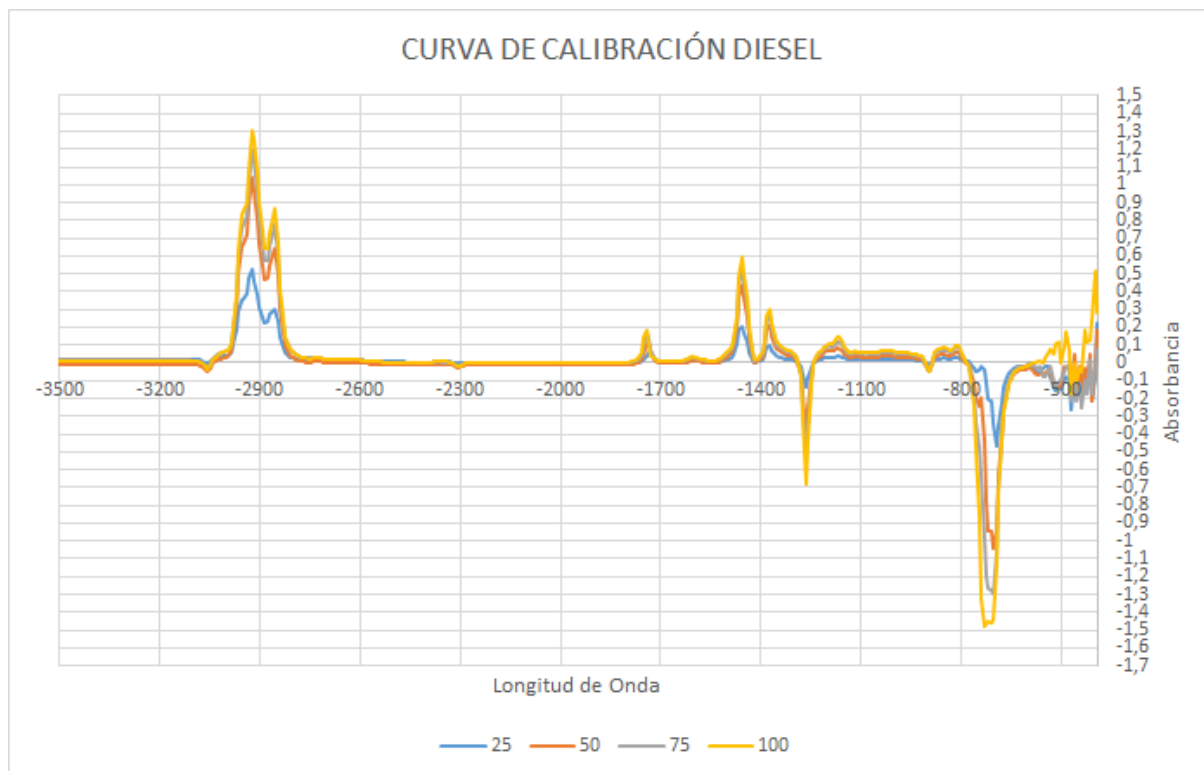
Fuente: Autores del proyecto, 2018.

## Anexo 7. Suelo contaminado con Diesel + KBr Réplica 3



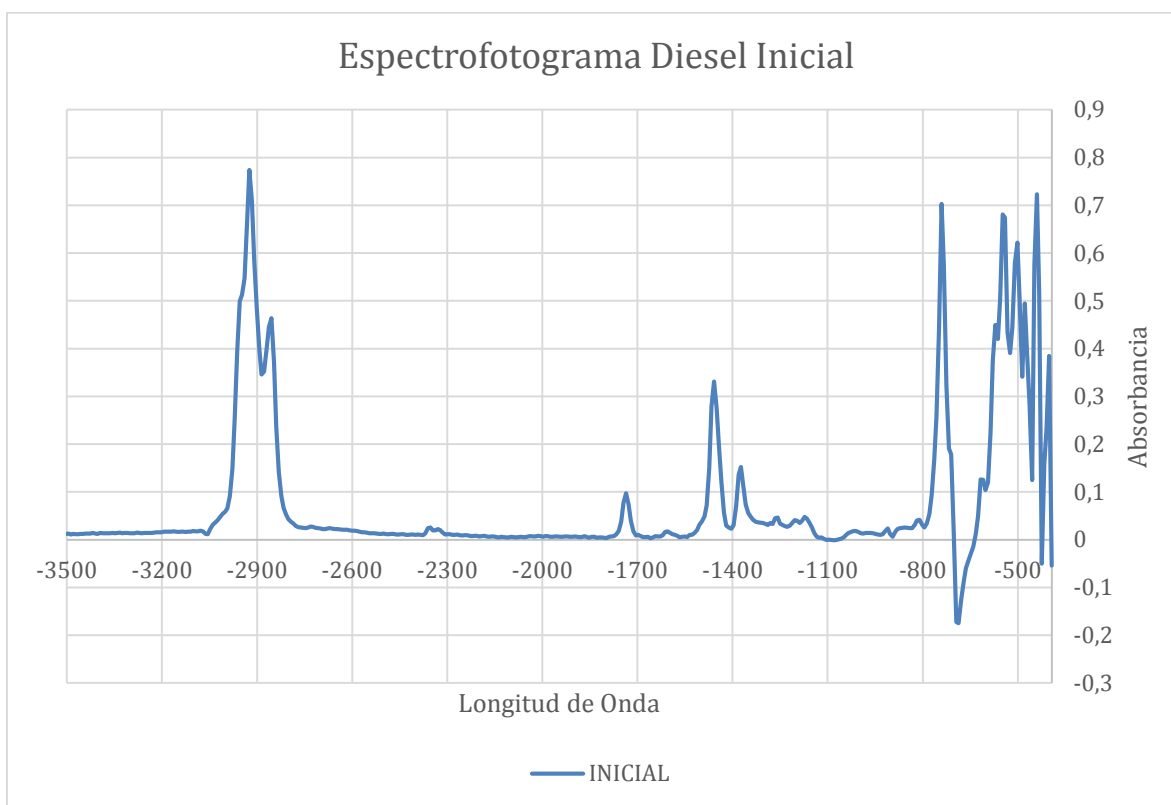
Fuente: Autores del proyecto, 2018.

## Anexo 8. Curva de Calibración Diesel



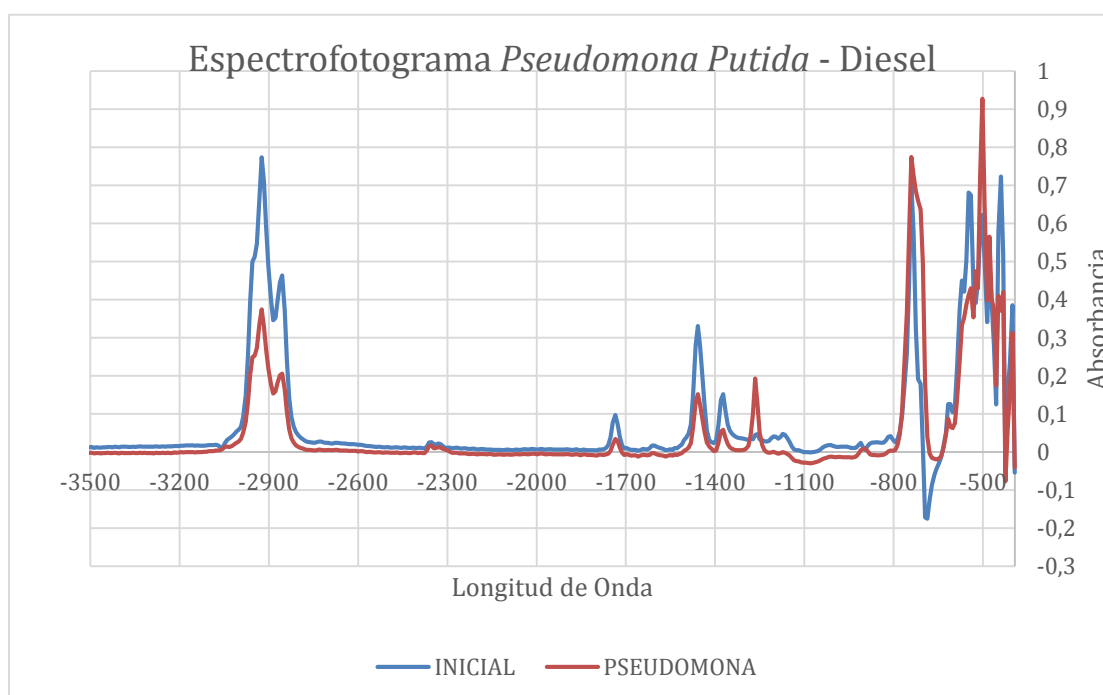
Fuente: Autores del proyecto, 2018.

## Anexo 9. Espectrofotograma Suelo Contaminado con Diesel Inicial



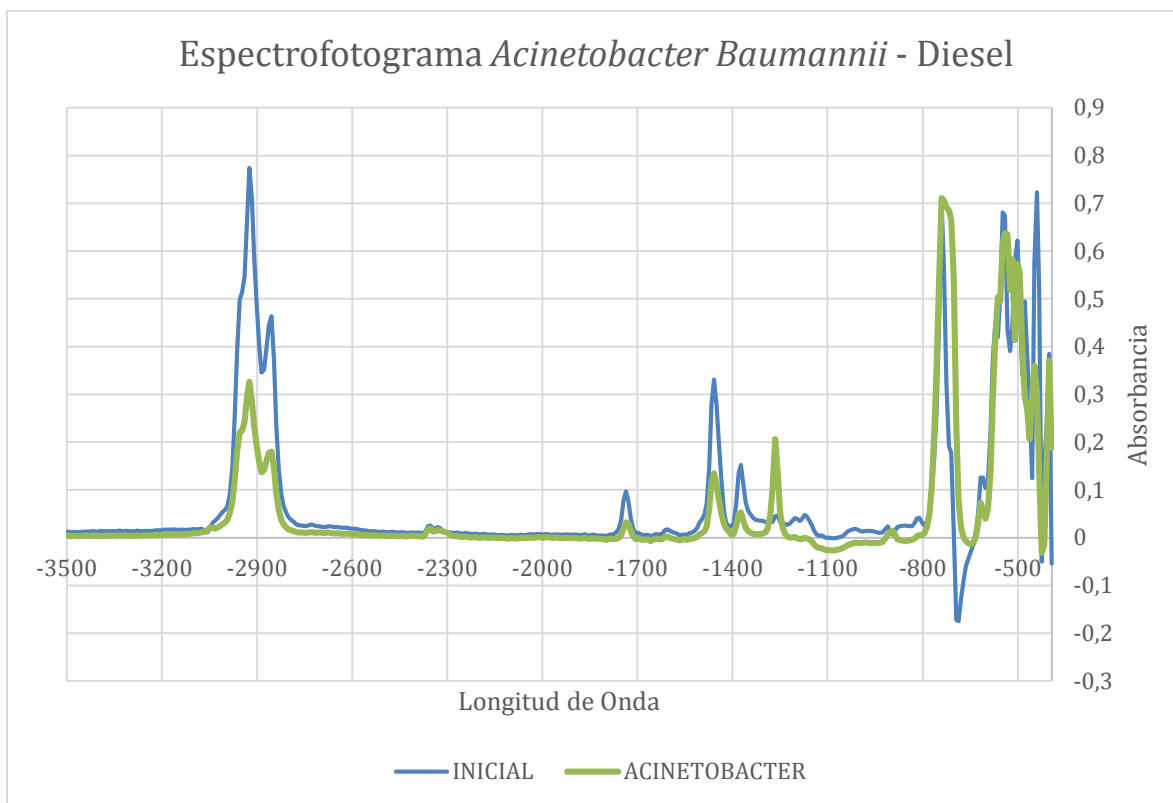
Fuente: Autores del Proyecto

## Anexo 10. Espectrofotograma *Pseudomona Putida* – Diesel



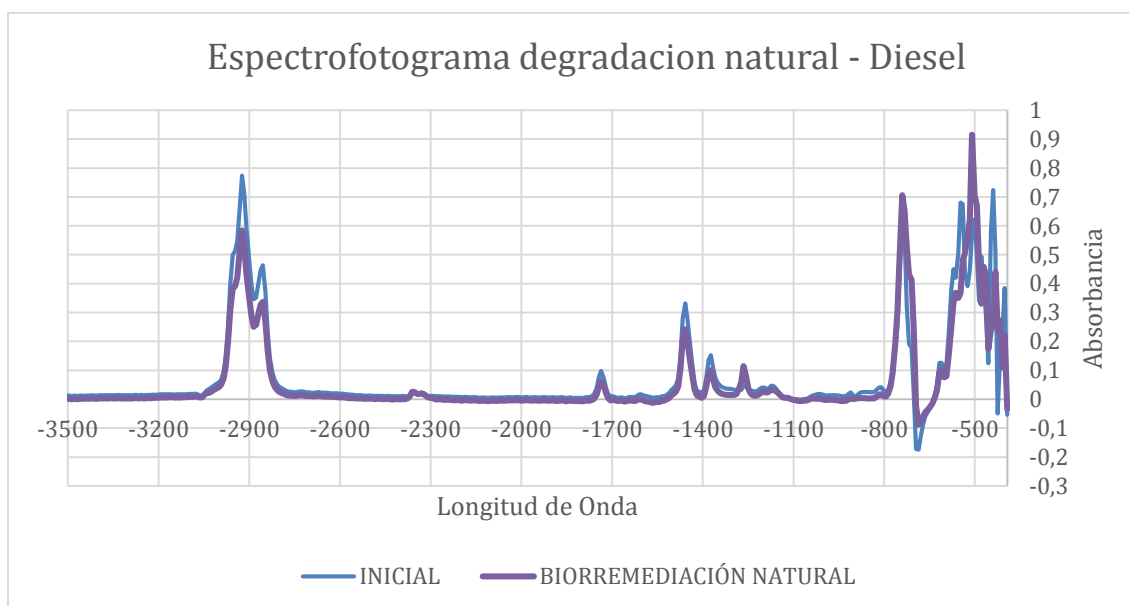
Fuente: Autores del proyecto, 2018.

## Anexo 11. Espectrofotograma *Acinetobacter Baumannii* - Diesel



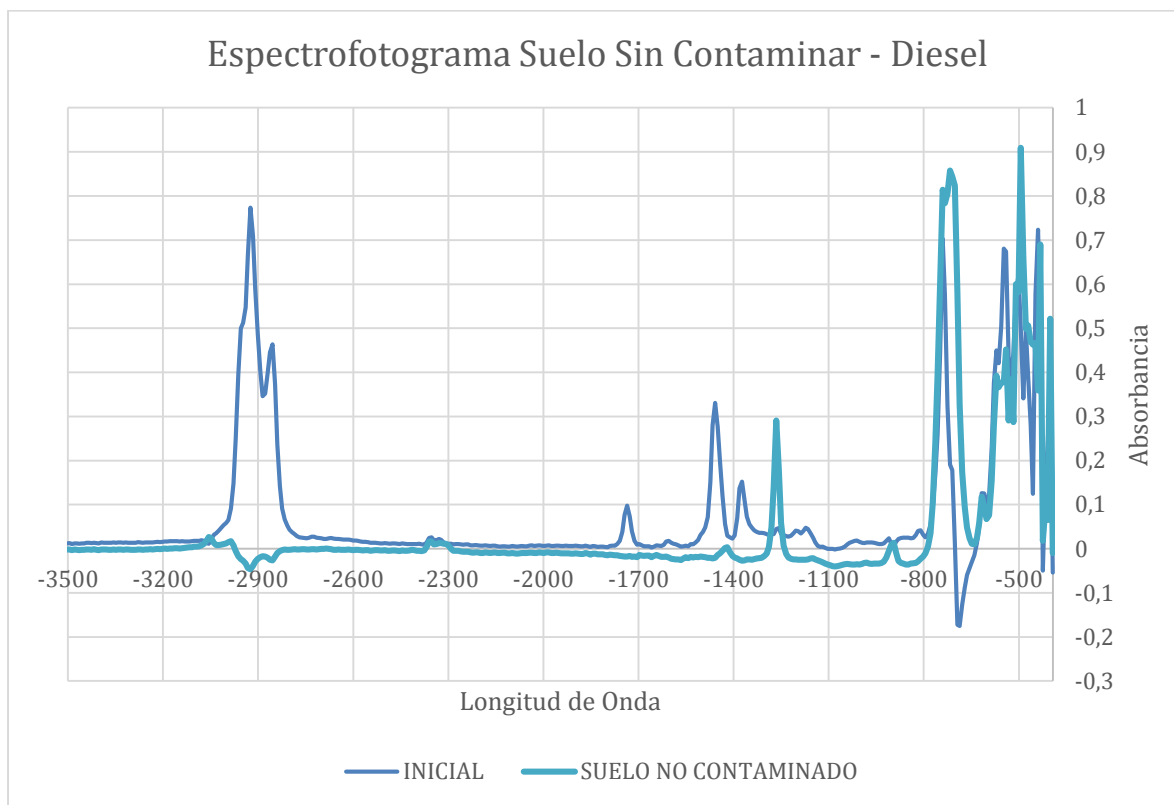
Fuente: Autores del Proyecto, 2018

## Anexo 12. Espectrofotograma Degradación Natural - Diesel



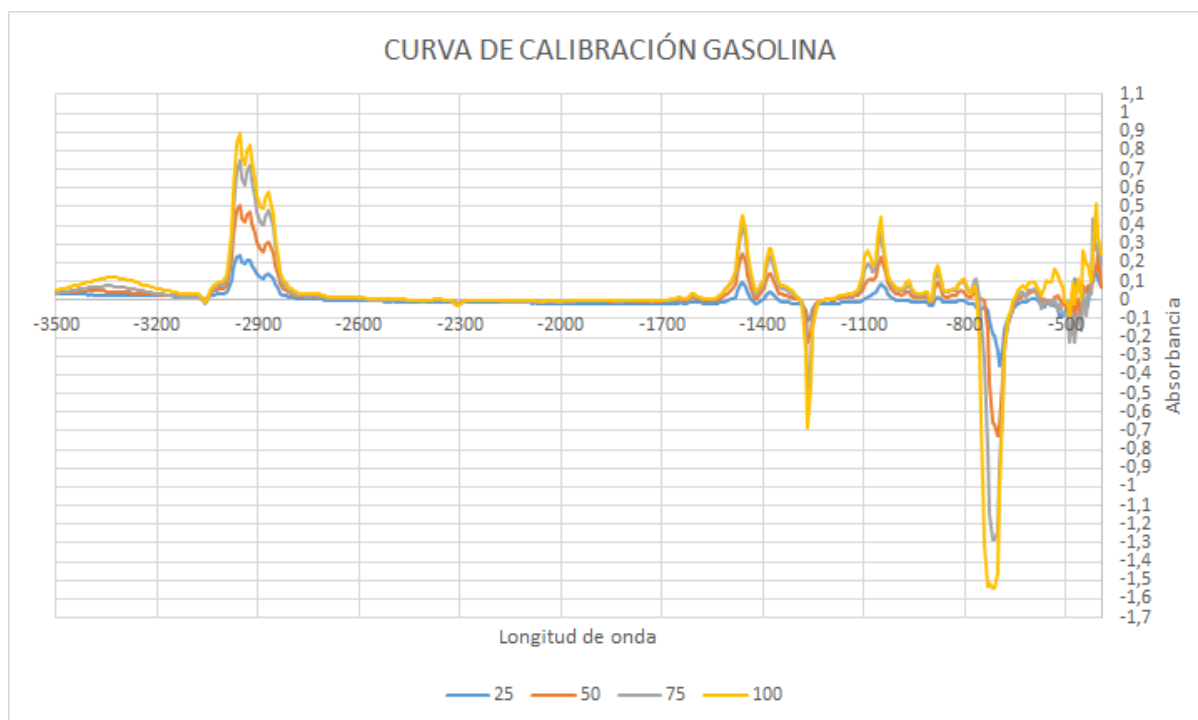
Fuente: Autores del Proyecto, 2018

### Anexo 13. Espectrofotograma Suelo sin Contaminar - Diesel



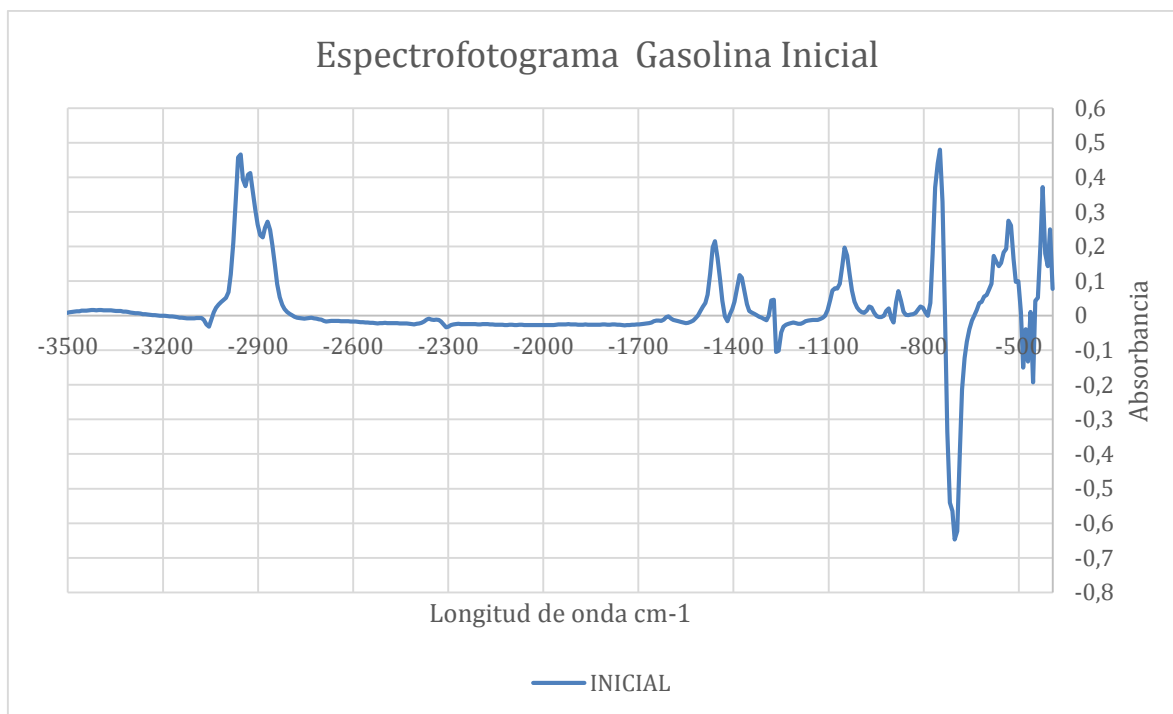
Fuente: Autores del Proyecto, 2018

### Anexo 14. Curva de Calibración Gasolina

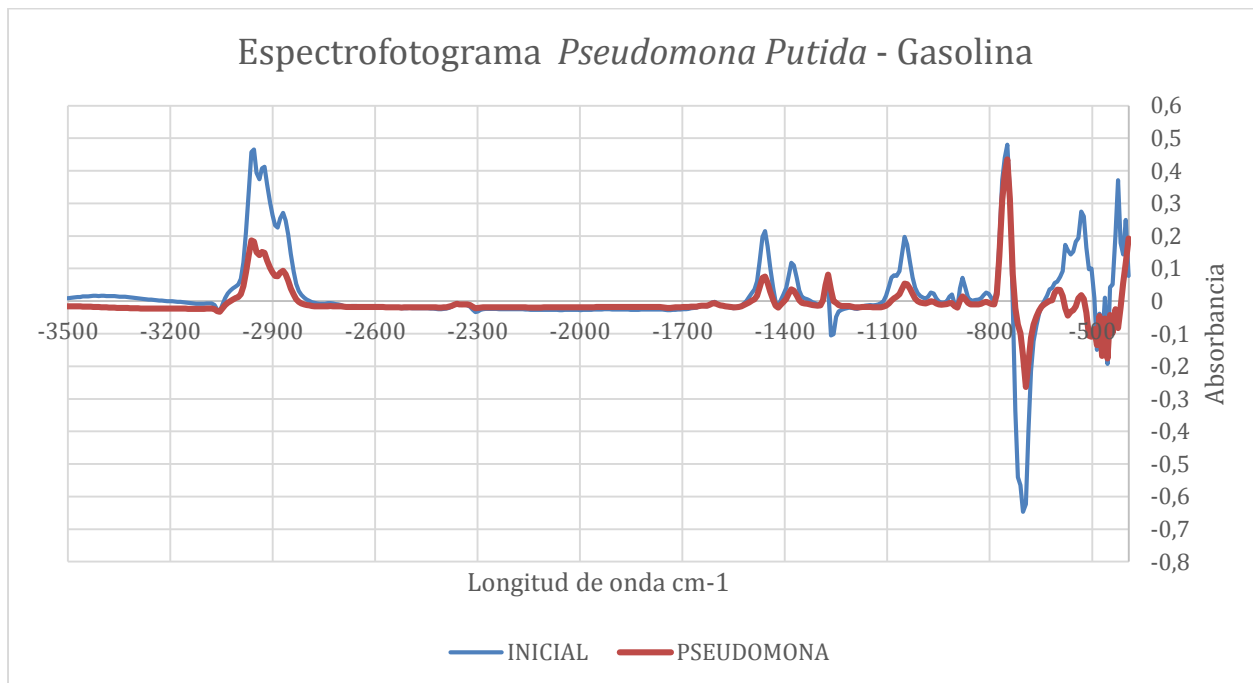


Fuente: Autores del proyecto, 2018.

## Anexo 15. Espectrofotograma Gasolina Inicial

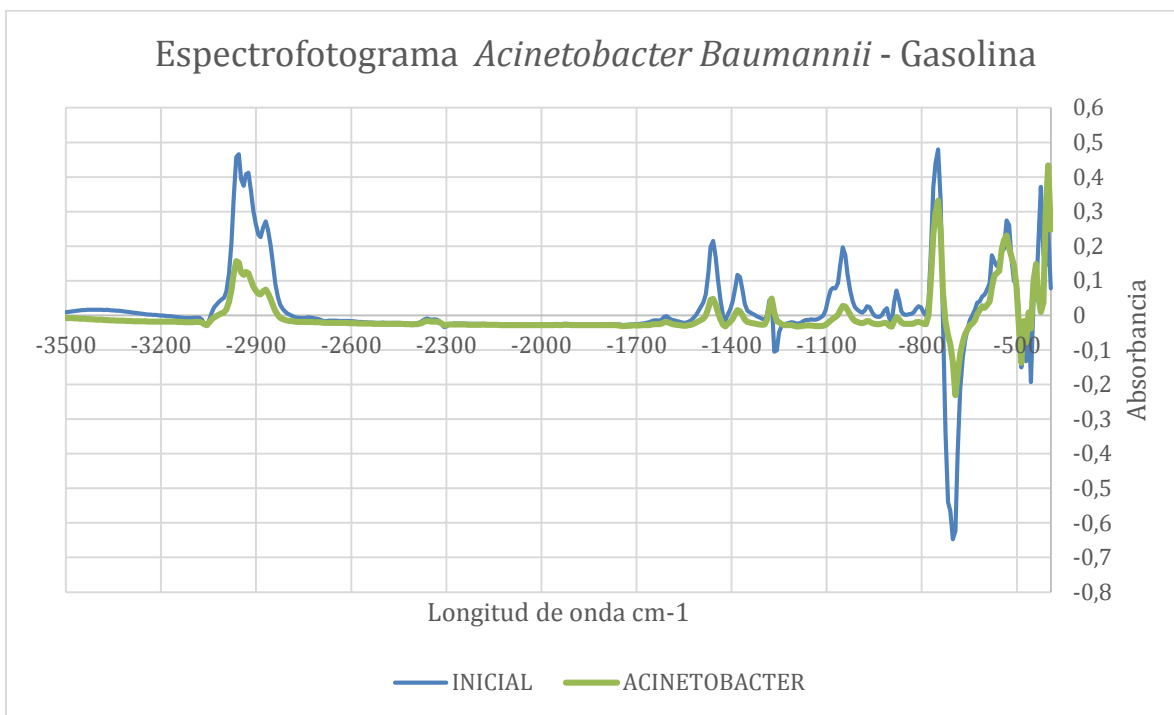


## Anexo 16. Espectrofotograma *Pseudomona putida* - Gasolina



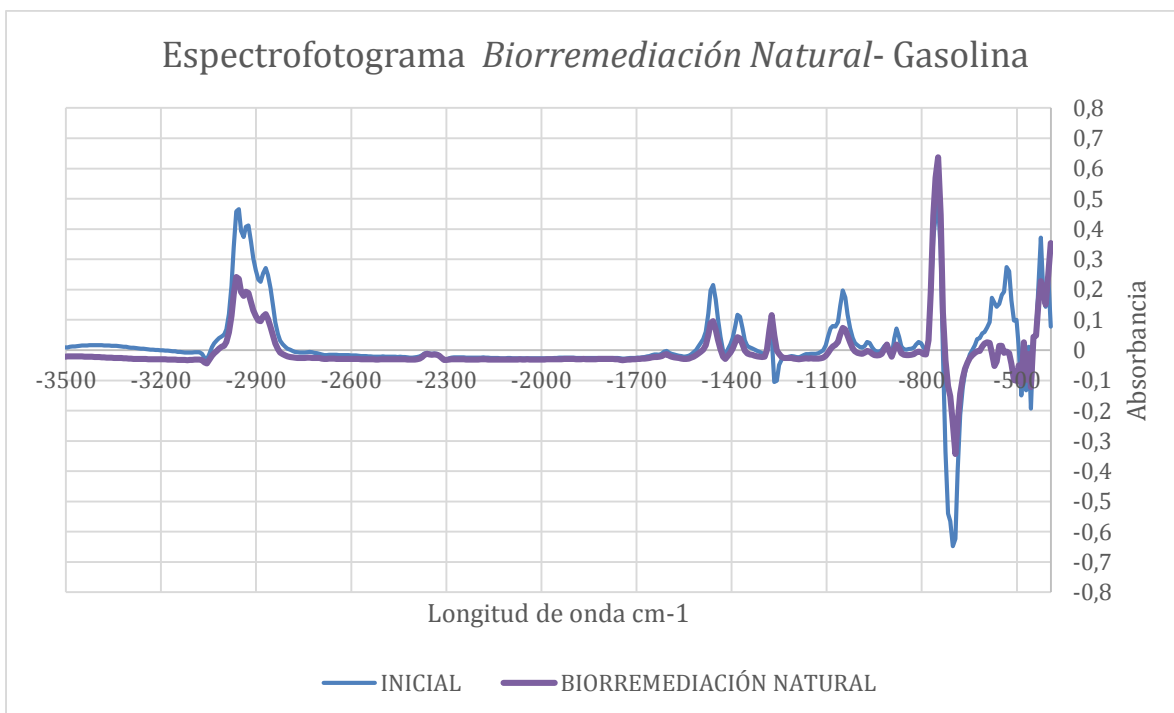
Fuente: Autores del Proyecto, 2018

## Anexo 17. Espectrofotograma *Acinetobacter Baumannii* - Gasolina



Fuente: Autores del Proyecto, 2018

## Anexo 18. Espectrofotograma Biorremediación Natural – Gasolina



Fuente: Autores del Proyecto



## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ✓ Benavides, J., Quintero, G., Guevara, A., Jaimes, D., Gutiérrez, S., & Miranda, J. (2005). *Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo*. Bogotá: NOVA.
- ✓ Boullosa, N. (Marzo de 2011). *faircompanies*. Recuperado el 2 de Marzo de 2016, de Biorremediación: 10 métodos de recuperación ecológica: <http://faircompanies.com/news/view/biorremediacion-10-metodos-recuperacion-ecologica/>
- ✓ “Comité de Seguridad, Higiene y Ambiente: Derrames de hidrocarburos y sus efectos sobre el ambiente”. 05 noviembre de 2015. En: [http://www.venamcham.org/index.php?option=com\\_content&view=article&id=291%3Acomite-de-seguridad-higiene-y-ambiente-derrames-de-hidrocarburos-y-sus-efectos-sobre-el-ambiente&catid=8%3Acomitesaldia&lang=es](http://www.venamcham.org/index.php?option=com_content&view=article&id=291%3Acomite-de-seguridad-higiene-y-ambiente-derrames-de-hidrocarburos-y-sus-efectos-sobre-el-ambiente&catid=8%3Acomitesaldia&lang=es)). Christie Carrero.
- ✓ Comunidad de Madrid. (12 de Mayo de 2007). *Comunidad de Madrid*. Obtenido de Comunidad de Madrid: [http://www.madrimasd.org/informacionidi/biblioteca/publicacion/doc/vt/vt6\\_tecnicas\\_recuperacion\\_suelos\\_contaminados.pdf](http://www.madrimasd.org/informacionidi/biblioteca/publicacion/doc/vt/vt6_tecnicas_recuperacion_suelos_contaminados.pdf).
- ✓ *Cosmos Online*. (2 de Marzo de 2016). Obtenido de Cosmos Online: <http://www.cosmos.com.mx/wiki/dnlh/bacterias-degradadoras-de-hidrocarburos>
- ✓ Fernández, L., Rojas, N., Roldan, T., Ramírez, M., & Zegarra, H. (2006). Hidrocarburos del petróleo en suelos. En *Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados* (págs. 90-115). D.F.





- ✓ García, R., Pandián, T., Aguilar, V., Ruiz, M., & Durán de Bazua, C. (S.F. de Julio - Diciembre de 2004). *Redalyc*. Recuperado el 21 de Agosto de 2014, de Redalyc: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=48219205>
- ✓ Gómez, & Murillo. (s.f.). Recuperado el 03 de Marzo de 2016, de ESPECTROSCOPIA INFRARROJA:  
<http://sistemas.fciencias.unam.mx/~fam/Infrarroja.pdf>
- ✓ B. Schrader, *Infrared and Raman Spectroscopy*, VCH, New York, 1995, p.2 y ss.
- ✓ Gutiérrez, M., & Droguet, M. (2002). LA CROMATOGRFÍA DE GASES Y LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS: *BOLETÍN INTEXTER (U.P.C.)*, 35.
- ✓ Jefatura de Estado Española. (22 de Abril de 1998). *Noticias Jurídicas*. Recuperado el 3 de Marzo de 2016, de Ley 10/1998, de 21 de abril, de residuos: [http://noticias.juridicas.com/base\\_datos/Admin/l10-1998.t1.html#a3](http://noticias.juridicas.com/base_datos/Admin/l10-1998.t1.html#a3)
- ✓ López, L., Hernández, M., Colín, C., Ortega, S., Cerón, G., & Franco, R. (2014). *Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología*. Vol. 3, Núm. 1, pp. 10-18. Ciudad de México.
- ✓ López, P. (2012). CLARIFICANDO LAS DIFERENCIAS ENTRE BIODEGRADACIÓN, BIOSANEAMIENTO,. *Rev. LatinAm. Metal. Mat.* , 2.
- ✓ S.F., (2014). *Práctica No. 2: Asepsia, esterilización y desinfección*. Bogotá.
- ✓ S.F., (2013). *Guía 2: Coloración de Gram y coloración de tinta china*. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Facultad de Ciencias de la Salud, Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico. Laboratorio de Microbiología General. Toro, M. A. T., & Quirama, J. F. R. (2012). Biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos en



Colombia/Bioremediation in soil contaminated with hydrocarbons in Colombia.

*Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 3(2), 37.

- ✓ Tellez, J., & Valderrama, B., (2000). *Microbiología del Petróleo y sus Derivados*. México D.F.: Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- ✓ Viñas Canals, M. (2005). *Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica*. Universitat de Barcelona.
- ✓ Llorente, C., (2008). *Daños punitivos y Derecho marítimo de Daños en los EEUU: el caso Exxon Valdez*. Obtenido de Legal Today Online: <http://www.legaltoday.com/actualidad/noticias/danos-punitivos-y-derecho-maritimo-de-danos-en-los-eeuu-el-caso-exxon-valdez>
- ✓ Tejedor, C., BIORREMEDIACIÓN, Recuperado el 10 de Noviembre 2017, de Bioquímica Tejedor en línea: [http://www2.uah.es/tejedor\\_bio/bioquimica\\_ambiental/biorremediacion.pdf](http://www2.uah.es/tejedor_bio/bioquimica_ambiental/biorremediacion.pdf).
- ✓ Braibant, C., (2014). *Estudio del potencial de degradación de los hidrocarburos por Acinetobacter sp. y Pseudomonas putida para su aplicación en la biorremediación de suelos contaminados*. Instituto Tecnológico de Costa Rica.
- ✓ Revista ARQHYS. 2012, 12. Cómo identificar un tipo de suelo. Equipo de colaboradores y profesionales de la revista ARQHYS.com. Obtenido 11, 2018, de <https://www.arqhys.com/construccion/identificacion-suelos.html>